

Der Einfluss des Hyaluronsäure-Systems auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.**

**der Fakultät für Biologie
an der Universität Duisburg-Essen**

**vorgelegt von
Alexandra Schütze
aus Hildburghausen**

Datum der Abgabe (Dezember 2015)

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Jens W. Fischer

2. Gutachter: Prof. Verena Jendrossek

3. Gutachter: Prof. Bertram Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses : Prof. George Iliakis

Tag der mündlichen Prüfung: 29. März 2016

Inhalt

1. Abkürzungsverzeichnis	6
2. Abbildungsverzeichnis	9
3. Tabellenverzeichnis	10
4. Einleitung	11
4.1. Krebs	11
4.2. Mammakarzinom	11
4.3. Ösophaguskarzinom	11
4.4. Strahlenbiologische Effekte	12
4.5. Therapieschema beim Mammakarzinom	13
4.6. Therapieschema beim Ösophaguskarzinom	13
4.7. Strahlungseffekte auf molekularer Ebene	14
4.7.1. Apoptoseinduktion durch Bestrahlung	14
4.7.2. Regulatoren strahleninduzierter Apoptose – Tumorprotein p53	15
4.7.3. Regulatoren strahleninduzierter Apoptose – Reaktive Sauerstoffspezies	16
4.7.4. Regulatoren strahleninduzierter Apoptose – <i>Bystander</i> -Effekt	16
4.8. Membranbrücken	17
4.9. Tumor-Stroma in der Strahlentherapie	17
4.10. Hyaluronsäuresystem	19
4.10.1. Hyaluronsäure und Hyaluronsäuresynthasen	19
4.10.2. Das Hyaluronsäuresystem und ionisierende Strahlung	20
4.10.3. Rezeptor der Hyaluronsäure-vermittelten Motilität	21
4.11. Zielsetzung	24
5. Material und Methoden	25
5.1. Zellkultur	25
5.1.1. Versuchsaufbau	25
5.1.2. Stimulationen der Zellen	27
5.1.3. Bestrahlung	27
5.1.4. Transfektion	28
5.1.5. Sub-G1-Messung	29
5.2. Bestimmung der Zellzahl	30
5.3. Bestimmung der Proliferationsrate	31

5.4.	Softagar-Assay	31
5.5.	Proteinexpressionsanalyse	32
5.6.	Zeitraffer-Mikroskopie	33
5.6.1.	Bestimmung und Quantifizierung von toten Zellen	33
5.6.2.	Zelluläre Migration	34
5.7.	mRNA-Expressionsanalyse	35
5.8.	Immunofluoreszenzfärbung und Affinitätszytochemie von HA	39
5.8.1.	Immunofluoreszenzfärbung	39
5.8.2.	Affinitätszytochemie von HA	39
5.8.3.	Hoechst-PI-Lebendzellfärbung	40
5.8.4.	Untersuchung des zellulären Transfers von Mitochondrien durch <i>Tunneling Nanotubes</i>	40
5.9.	Signaltransduktionsanalyse	41
5.10.	Bestimmung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies	42
5.10.1.	DCF-Methode	42
5.10.2.	DHE-Messung	42
5.11.	Statistik	43
6.	Ergebnisse	44
6.1.	Strahlenantwort in Mammakarzinom-Zelllinien	44
6.1.1.	Zelluläre Antwort von Mammakarzinomzellen auf ionisierende Bestrahlung	44
6.1.2.	Signalwegaktivierung durch ionisierende Strahlung	45
6.1.3.	p53-Status in MCF-7 und MDA-MB-231-Zellen	47
6.1.4.	Regulation von RHAMM durch p53	47
6.1.5.	Einfluss von RHAMM auf den zellulären Phänotyp von Mammakarzinom-Zelllinien	48
6.1.6.	Rolle des Hyaluronsäurerezeptors RHAMM in der Strahlenantwort von Mammakarzinom-Zelllinien	50
6.1.7.	Rolle der Spleißvarianten des Hyaluronsäurerezeptors <i>RHAMM</i> in der Strahlenantwort von Mammakarzinom-Zelllinien	52
6.1.8.	Pharmakologische Beeinflussung zur Strahlensensitivierung in Mammakarzinom-Zelllinien	55
6.1.9.	Zusammenfassung RHAMM in der Strahlenantwort	56

6.2.	Rolle des Tumorstromas in der Strahlentherapie	57
6.2.1.	Apoptoseinduktion durch Fibroblasten	57
6.2.2.	Fibroblasten-vermittelter Tumorzelltod ist abhängig von direktem Zell-Zell-Kontakt	59
6.2.3.	Einfluss von ionisierender Strahlung auf das stromale Hyaluronsäuresystem	60
6.2.4.	Reaktive Sauerstoffspezies vermitteln die Repression stromaler Hyaluronsäuresynthase 2	65
6.2.4.1.	Radikalfänger können Fibroblasten-vermitteltes Tumorzellsterben inhibieren	65
6.2.4.2.	HAS2 ist ein <i>downstream-target</i> von ROS	68
6.2.5.	<i>Tunneling nanotubes</i> als Mechanismus zur Hyaluronsäuresynthase 2-abhängigen Apoptoseinduktion in Tumorzellen	70
6.2.6.	Zusammenfassung Tumorstroma in der Strahlenantwort	74
7.	Diskussion	75
7.1.	Strahlungsresistenzmechanismen	75
7.2.	RHAMM-Varianten in der zellulären Strahlenantwort	76
7.3.	Stroma-vermitteltes Tumorzellsterben	82
7.4.	Ausblick	89
8.	Zusammenfassung	91
9.	Literaturverzeichnis	92
10.	Anhang	108
11.	Danksagung	112
12.	Lebenslauf	113
12.1.	Veröffentlichungen	114
12.1.1.	Fachzeitschriften	114
12.1.2.	Veröffentlichte Kongressbeiträge	114
13.	Eidesstattliche Erklärungen	115

1. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
18S	18S ribosomale RNA
3D	3-dimensional
4-MU	4-Methylumbelliferon
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AURKA	Aurora Kinase A
BAX	BCL2-assoziiertem X-Protein
BCL2	B-Zelllymphoma 2-Protein
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRCA1	Brustkrebsgen <i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	Brustkrebsgen <i>Breast Cancer 2</i>
CAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten (<i>cancer-associated fibroblast</i>)
CB	Cytochalasin B
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
cDNA	kodierende DNA
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccimidylester
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
C _t	Schwellenwerte
DCF	2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat
DHE	Dihydroethidium
DMEM	<i>Dubecco's</i> modifiziertem <i>Eagle's</i> Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ERK1,2	<i>extracellular-signalregulated kinase 1, 2</i>
ESCC	Ösophagusplattenepithelkarzinomzelllinien KYSE410
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	Fötales bovines Serum
FCS	<i>forward scatter</i>
FGF-2R	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRN	grünen Kanal
Gy	Gray
h	Stunden
H ₂ DCFDA-AM	Diacetat 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HA	Hyaluronsäure
HARE	HA-Rezeptor für Endozytose
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HAS1	Hyaluronsäuresynthase 1
HAS2	Hyaluronsäuresynthase 2

HAS3	Hyaluronsäuresynthase 3
hF	humane Fibroblasten
Hg	Hedgehog
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor
HO [•]	Hydroxylradikale
HRP	Meerrettichperoxidase
HYAL1	Hyaluronidasen 1
HYAL2	Hyaluronidasen 2
HYBIP	HA-bindendes Protein involviert in HA-Depolarisierung
IARC	Internationalen Agentur für Krebsforschung
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
IL-33	Interleukin 33
INT	<i>p</i> -Iodonitrotetrazoliumviolett
J	Joule
kg	Kilogramm
KIF5	Kinesin-verwandtes Protein 5
kV	Kilovolt
LAYN	Layilin
LYVE-1	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1</i>
mA	Milliampere
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio	Millionen
miR	microRNA
Miro1	mitochondriale Rho GTPase 1
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteasen
MMP-7	Matrixmetalloproteasen 7
MMP-9	Matrixmetalloproteasen 9
mRNA	Boten-RNA
MST-1R	Makrophagen-stimulierenden Rezeptor 1
NAC	N-Acetylcystein
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	nuklearen Transkriptionsfaktors NF-κB
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
O ₂ ^{•-}	Superoxid
OSC-1	<i>Oesophagus squamous cell carcinoma 1</i>
p53	Tumorprotein p53
p63	Tumorprotein p63
p73	Tumorprotein p73
PBS	Phosphat-gepuffertem Puffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktorrezeptor
PE	roten Wellenlängenbereich (535-615 nm; Cy3)
PFA	Paraformaldehyd
PFT-μ	Pifithrin-μ
PI	Propidiumiodid
PSC	Pankreas-Stellatzellen

qRT-PCR	quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RedA	Fläche der roten Fluoreszenz
RedH	Höhe der roten Fluoreszenz
RHAMM	Rezeptor für HA-vermittelnde Motilität
RHAMMpan	RHAMM-Panel (beinhaltet alle Spleiß-Varianten)
RHAMMv1	RHAMM-Variante 1
RHAMMv2	RHAMM-Variante 2
RHAMMv3	RHAMM-Variante 3
RHAMMv4	RHAMM-Variante 4
RNA	Ribonukleinsäure
RO ⁻	Alkoxy
RON	Recepteur d'Origine Nantais
ROO ⁻	Peroxy
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut-Medium</i>
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler
siKon	siKontrolle
siRNA	kurzer interferierender RNA
SSC	<i>side scatter</i>
SSE	Natriumselenit (<i>sodium selenite</i>)
TBP	TATA-bindendes Protein
TBST	Tris-gepuffertem Puffer mit Tween 20
TE	Trypsin/EDTA
TGF-β	transformierendem Wachstumsfaktor β
TGF-β1	transformierendem Wachstumsfaktor β 1
TLR2	Toll-ähnlichen Rezeptoren 2
TLR4	Toll-ähnlichen Rezeptoren 4
TNT	<i>Tunneling nanotubes</i>
TPX2	<i>Targeting protein for Xklp2</i>
USA	<i>United States of America</i>
V	Volt
x	-fach
YAP	Yes-assoziiertem Protein
Yel	gelber Kanal (583/26 nm)

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Übersicht über das HA-System
Abbildung 2	Übersicht der RHAMM-Isoformen
Abbildung 3	Experimentelles Design für die Kokultivierung von Tumor- und Stromazellen
Abbildung 4	Experimentelles Design zur Durchführung der Überstandsversuche
Abbildung 5	Punktdiagramme und Histogramme in der durchflusszytometrischen Messung von sub-G1
Abbildung 6	Exemplarische Darstellung des Absterbens einer Tumorzelle im Zeitverlauf
Abbildung 7	Endogene Kontrollen für die qRT-PCR
Abbildung 8	Untersuchung der <i>RHAMMv1</i> - und <i>RHAMMv2</i> -spezifischen Primer durch Schmelzkurvenanalyse und Sequenzierung der resultierenden PCR-Produkte
Abbildung 9	Strahlenantwort von Mammakarzinomzellen
Abbildung 10	Signalwegsaktivierung von radiosensitiven MCF-7-Zellen
Abbildung 11	Proteinexpressionsanalyse von p53 und p38 in MCF-7-Zellen
Abbildung 12	Rolle von p53 bei dem strahlungsabhängigen Zelltod
Abbildung 13	p53-Expression in Mammakarzinomzellen in der zellulären Strahlenantwort
Abbildung 14	Zusammenhang zwischen p53 und RHAMM
Abbildung 15	Differentielle Regulation des zellulären Phänotyps durch <i>RHAMM</i> in Mammakarzinomzellen
Abbildung 16	<i>RHAMM-Knockdown</i> verändert die Migration und das Überleben von MDA-MB-231-Zellen
Abbildung 17	<i>RHAMM</i> -Expression in MCF-7- und MDA-MB-231 nach Bestrahlung mit 2 Gy
Abbildung 18	Regulation von <i>RHAMM</i> -Spleißvarianten in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen mit Bestrahlung in Hinblick auf Apoptose
Abbildung 19	Regulation von <i>RHAMM</i> -Spleißvarianten in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen mit Bestrahlung in Hinblick auf Proliferation
Abbildung 20	Pharmakologische Inhibition des <i>RHAMM</i> -Liganden HA
Abbildung 21	Pharmakologische Inhibition des <i>RHAMM</i> -Liganden HA führt sowohl in MCF-7- als auch in MDA-MB-231-Zellen nach Bestrahlung zu Apoptose
Abbildung 22	Bestrahltes Stroma verstärkt die Apoptose von KYSE-410 Tumorzellen
Abbildung 23	Bestrahlte Fibroblasten verstärken die Apoptose von OSC-1 Tumorzellen
Abbildung 24	Direkter Zellkontakt vermittelt Fibroblasten-induziertes Tumorzellsterben
Abbildung 25	HAS-Expressionsprofil in ESCC und NHDF
Abbildung 26	Hyaluronsäure-System in der zellulären Strahlenantwort
Abbildung 27	Hyaluronsäure-System in der zellulären Strahlenantwort
Abbildung 28	Stromale siRNA-Transfektion gegen HAS2 induziert Tumorzellsterben
Abbildung 29	ROS-Level in Tumorzellen und Kokulturen mit Fibroblasten
Abbildung 30	Gesteigerte ROS-Level in Fibroblasten können durch Radikalbildner inhibiert werden

Abbildung 31	Radikalfänger können Fibroblasten-vermitteltes Tumorzellsterben unterdrücken
Abbildung 32	Radikalfänger können Fibroblasten-vermitteltes Tumorzellsterben unterdrücken
Abbildung 33	Herabregulation von HAS2 in Fibroblasten resultiert in basalen ROS-Leveln
Abbildung 34	ROS-Induktion durch Elesclomol führte zu einer Herabregulation von HAS2
Abbildung 35	Relative HAS2 mRNA-Expression in bestrahlten Fibroblasten, die mit Radikalfängern stimuliert wurden
Abbildung 36	Überprüfung der Mitotracker-Färbung
Abbildung 37	Inhibition von <i>tunneling nanotubes</i> und p53-Translokation in Mitochondrien unterdrückten Fibroblasten-vermitteltes Tumorzellsterben
Abbildung 38	<i>Tunneling nanotubes</i> als möglicher Mechanismus, der Tumorzelltod durch direkten Zellkontakt der Tumorzellen mit Fibroblasten hervorrief
Abbildung 39	Zusammenfassende Abbildung zur Rolle von RHAMM für die Strahlenantwort von Mammakarzinomzellen
Abbildung 40	Zusammenfassende Abbildung der Kokultivierung von Fibroblasten mit bestrahlten Tumorzellen
Abbildung 41	Transfektionseffizienz der designten siRNAs der RHAMM-Varianten
Abbildung 42	Transfektionseffizienz der designten siRNAs der RHAMM-Varianten-Kombinationen

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Stimulanzienübersicht
Tabelle 2	Übersicht der Transfektionsbedingungen für die verwendeten Zelllinien
Tabelle 3	Übersicht der verwendeten siRNAs
Tabelle 4	Liste der verwendeten Primärantikörper
Tabelle 5	Liste der verwendeten Sekundärantikörper für Western Blots
Tabelle 6	Liste der verwendeten Primer für die qRT-PCR
Tabelle 7	Liste der verwendeten Antikörper und Farbstoffe für Immunozytochemie
Tabelle 8	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen
Tabelle 9	Zusammensetzung der Gele für die Westen Blot-Analyse

4. Einleitung

4.1. Krebs

Krebserkrankungen sind die weltweit häufigste Todesursache. Laut einer Studie der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC), gab es im Jahr 2012 8,2 Mio. durch Krebs verursachte Todesfälle (Stewart & Wild 2014). Laut Prognosen wird ein Anstieg der Neuerkrankungen von 14,1 Mio. auf jährlich 19,3 Mio. bis zum Jahr 2025 erwartet (Stewart & Wild 2014).

4.2. Mammakarzinom

Im Jahr 2013 sind laut statistischem Bundesamt in Deutschland über 18.000 Menschen an Brustkrebs gestorben. Mammakarzinome stellen somit nach Lungen- und Bronchialkrebs die zweithäufigste Todesursache durch Krebs dar. Risikofaktoren sind Hormonungleichgewicht sowie ein erhöhter *Body Mass Index* (Crispo *et al.* 2015). Durch Mammographien ist eine Früherkennung möglich, wodurch in Ländern mit entsprechenden Vorsorge-Untersuchungen, wie Deutschland, den USA und England, bereits ein Rückgang der Mortalität festgestellt werden konnte. Auch die Identifizierung von Biomarkern, wie beispielsweise Rezeptoren oder Mutationen in Risikogenen, charakterisiert die Erkrankung und ermöglicht die Durchführung einer zielgerichteten Therapie sowie eine Verbesserung des Überlebens der Patienten. Beschriebene Risikogene sind beispielsweise das Brustkrebsgen 1 (*BRCA1*) oder 2 (*BRCA2*). Keimbahnmutationen in *BRCA1* und *BRCA2* scheinen ursächlich für etwa 20% alle Mammakarzinome zu sein (Thompson & Easton 2004).

4.3. Ösophaguskarzinom

2012 wurden weltweit 456.000 maligne Neoplasien des Ösophagus neu diagnostiziert. 400.000 Patienten starben an den Folgen dieser Erkrankung. Laut statistischem Bundesamt starben 2013 in Deutschland über 4.200 Männer an Speiseröhrenkrebs. Risikofaktoren sind Rauchen, Alkoholkonsum und Übergewicht (Porschen *et al.* 2015). In den letzten Jahren hat es wenig Fortschritte in der Behandlung von Speiseröhrenkrebs gegeben und so erleidet ein Großteil der Patienten Tumorrezidive, die schließlich zum Tod führen (Stahl *et al.* 2012). Eine

Behandlung ist aufgrund der anatomischen Gegebenheiten anspruchsvoll. Das Ösophaguskarzinom wird in die Gruppen Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom eingeteilt.

4.4. Strahlenbiologische Effekte

Neben der chirurgischen Resektion und der Chemotherapie ist die Strahlentherapie ein fester Bestandteil der onkologischen Behandlung. Mehr als die Hälfte aller Krebspatienten werden im Verlauf ihrer Erkrankung eine Strahlentherapie angewendet (Delaney *et al.* 2005). Dabei kann die Strahlung als Monotherapie oder im Rahmen einer gleichzeitigen Gabe von Zytostatika (Radiochemotherapie) erfolgen. Auch eine palliative Anwendung ist möglich.

Die Strahlentherapie nutzt ionisierende Strahlung, um Erkrankungen wie Arthrosen, Gelenkschmerzen und Krebs zu behandeln. Bei der onkologischen Strahlentherapie spielen dabei weniger direkte Effekte auf die Desoxyribonukleinsäure (DNA) eine Rolle, als vielmehr die Ionisierung von Wassermolekülen. Die so entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) schädigen indirekt die DNA. Es können bis zu 20 verschiedene Arten der DNA-Schädigung erfolgen, wie Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche und DNA-DNA/Protein-Verknüpfungen (Santivasi & Xia 2014). Üblicherweise wurde den DNA-Schäden die Hauptrolle für einen strahleninduzierten Zelltod zugeordnet. Heute weiß man jedoch, dass auch DNA-unabhängige Mechanismen den Tod einer bestrahlten Zelle herbeiführen können. Veränderungen von Mitochondrien sowie die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase sind zwei dieser Mechanismen (Corre *et al.* 2013; Kobashigawa *et al.* 2015). Tumorzellen können effektiv durch Bestrahlung abgetötet werden, allerdings ist die verabreichte Dosis limitiert, denn die Schäden des Normalgewebes müssen so gering gehalten werden, dass zwar Tumorzellen sterben, aber gesunde Zellen weitgehend unbeeinträchtigt bleiben. Zur Minimierung von Schäden des Normalgewebes werden Gesamtdosen fraktioniert verabreicht (Fowler 2001). Die absorbierte Dosis wird als Energie (J) pro Gewicht (kg) in der SI-Einheit Gray (Gy) angegeben (Allisy-Roberts 2005).

4.5. Therapieschema beim Mammakarzinom

Eine Strahlentherapie ist stets indiziert bei invasiven Mammakarzinomen und brusterhaltender Operationen (Lalani *et al.* 2014). Die Strahlungsdosen bestehen bei der konventionellen Strahlentherapie aus einer Einzeldosis von 1,8 bis 2 Gy, die 5-mal pro Woche verabreicht wird, bis zu einer Gesamtdosis von 50 Gy. Alternativ kann die Strahlungsdosis in Form einer Hypofraktionierung verabreicht werden, indem mit einer Einzeldosis von 2,67 Gy behandelt wird. Trotz etablierter Therapieregime ist die Entwicklung von Resistenzmechanismen ein ernst zu nehmendes Problem. Tumore können sich der Behandlung entziehen oder auch zu lokalen Rezidiven sowie Metastasen führen (Boyages *et al.* 1999). Zudem korreliert die Strahlentherapie bei Brustkrebspatienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen und kardiovaskulären Erkrankungen (Perrier *et al.* 1998; Hooning *et al.* 2007). Es besteht daher Forschungsbedarf, um die Risiken bestehender Therapieverfahren zu minimieren und deren Effizienz zu erhöhen.

4.6. Therapieschema beim Ösophaguskarzinom

Eine Bestrahlung beim Ösophaguskarzinom ist vor allem bei fortgeschrittenen Tumoren indiziert. Die Therapie erfolgt neoadjuvant oder adjuvant, stets in Kombination mit Chemotherapeutika bei einer Gesamtdosis von 40-50,4 Gy in konventioneller Fraktionierung. Ist der Tumor inoperabel, wird ebenfalls durch eine Gesamtdosis von 50 Gy mit zusätzlicher Gabe von Chemotherapeutika behandelt (Porschen *et al.* 2015). Die Strahlentherapie dient in diesem Fall hauptsächlich der Verringerung des Tumolvolumens und der Verhinderung von Mikrometastasen. Außer bei frühen, operablen Tumorstadien wird insgesamt eine neoadjuvante Chemoradiotherapie bevorzugt (Gwynne *et al.* 2014). Studien zu neoadjuvanten Therapien zeigten ein verbessertes Gesamtüberleben durch Chemoradiotherapie bei Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu Adenokarzinomen (van Hagen *et al.* 2012). Das Überleben von Patienten, die kein Ansprechen auf neoadjuvante Therapie zeigen, ist mit einer schlechten Prognose korreliert (Gwynne *et al.* 2014).

4.7. Strahlungseffekte auf molekularer Ebene

Es gibt vier unterschiedliche Arten des Zelltodes durch Bestrahlung, den klonogenen (reproduktiven) Zelltod, die Nekrose, die Seneszenz und die Apoptose. Bei einem klonogenen Zelltod bleiben die Zellen nach der Bestrahlung noch metabolisch aktiv, verlieren aber ihre Teilungsfähigkeit (Mitosetod) (Portugal *et al.* 2010). Die Zellen sind somit nicht mehr in der Lage, Kolonien zu bilden. Der Koloniebildungsassay spielt daher als Goldstandardmethode zur Untersuchung des klonogenen Zelltods in der Strahlenbiologie eine bedeutende Rolle (Katz *et al.* 2008). Die Nekrose bewirkt einen raschen Funktionsverlust der Zelle. Der Verlust der Membranintegrität bewirkt, dass Zellorganelle und -bestandteile freigesetzt werden, die eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe hervorrufen (Rainaldi *et al.* 2003). Seneszenz bedeutet permanenten Zellzyklusarrest bei dem die Zellen zwar noch metabolisch aktiv sind, sich allerdings nicht mehr teilen können (Eriksson & Stigbrand 2010). Die Apoptose ist eine Unterart des programmierten Zelltodes und wird in den folgenden Kapiteln im Kontext von Bestrahlung genauer besprochen (Silva *et al.* 2014).

4.7.1. Apoptoseinduktion durch Bestrahlung

Da angenommen wird, dass der Grad der Auslösung von Apoptose die Radiosensitivität voraussagen kann (Story *et al.* 1994), wird in diesem Abschnitt näher auf die Mechanismen der Apoptose eingegangen. Apoptose ist als programmierter Zelltod ein wichtiger Bestandteil unserer Physiologie. Durch den gezielten Abbau von unbenötigten oder geschädigten Zellen wird Gewebeentwicklung und -homöostase kontrolliert (Fuchs & Steller 2015). Bereits 1955 beobachtete Schrek in bestrahlten Lymphozyten des Kaninchens einen apoptotischen Phänotyp, den er als lappenähnlich („lobulated“), vakuolisiert und mit einem pyknotisch, fragmentierten Zellkern beschreibt. Abgrenzend von der Nekrose wurde die Apoptose erstmalig 1972 von Kerr *et al.* beschrieben. Typische Apoptose-Charakteristika sind gekennzeichnet durch eine spezifische Morphologie, wie dem Zusammenziehen der Zelle, Bläschenbildung („blebbing“), Bildung von Nukleusfragmenten, DNA-Fragmentierung und -Degradation, Phosphatidylserin-Externalisierung sowie der Aktivierung von Caspasen (Lockshin & Zakeri 2004). Das

Tumorprotein p53 (p53) wird in der Literatur als wichtiger Faktor für die Apoptose-Aktivierung nach Bestrahlung beschrieben (Kuerbitz *et al.* 1992).

4.7.2. Regulatoren strahleninduzierter Apoptose – Tumorprotein p53

Als sogenannter „Wächter des Genoms“ kann p53 durch die Regulation von B-Zelllymphoma 2-Protein (BCL2) und BCL2-assoziiertem X-Protein (BAX) zu Apoptose führen (Lane 1992; Selvakumaran *et al.* 1994). p53 ist wichtig für die Eliminierung von geschädigten Zellen. Eine Aktivierung von p53 führt zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und ermöglicht somit der Zelle, Schäden zu detektieren und zu reparieren. Hierbei ist p53 ebenfalls maßgeblich an der Induktion von Reparatursignalwegen beteiligt (Helton & Chen 2007). Können DNA-Schäden nicht repariert werden, kann p53 durch die Induktion von apoptotischen Proteinen die Elimination von Tumorzellen regulieren oder sogar direkt über die Translokation in Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom C auslösen, welches wiederum Apoptose hervorruft (Mihara *et al.* 2003).

Zellen, deren p53 mutiert vorliegt, verlieren diese wichtigen regulatorischen Eigenschaften und sind dadurch nicht in der Lage, DNA-Schädigungen zu reparieren oder Apoptose zu initiieren. Der Verlust von funktionsfähigem p53 kann daher zu weiteren Mutationen führen, so dass das transformierende Potenzial steigt. Mutiertes p53 kommt in etwa 50 % aller Tumoren vor (Hollstein *et al.* 1991). Ein Großteil der Mutationen (beispielsweise R248W und R273H) verhindert die Sequenz-spezifische DNA-Bindeaktivität zu Wildtyp-p53-Responseelementen, wodurch Zielgene nicht mehr aktiviert werden können (Kato *et al.* 2003). So verliert p53 die Fähigkeit, die Transkription seines eigenen Inaktivators *mouse double minute 2 homolog* (MDM2) zu initiieren und reichert sich daher in der Zelle an (Barak *et al.* 1994). p53-Mutationen können zudem Wildtyp-p53-Funktionen durch Heterooligomerisierung inhibieren (Milner & Medcalf 1991), solche Mutationen werden als dominant negativ bezeichnet. Weitere Mutationen können zudem zu neuen Funktionen von p53 führen. So können R172H-Mutationen durch Bindung an p63 und p73 Wachstum und Invasion vermitteln (Terzian *et al.* 2008). Bereits vor über 20 Jahren wurde festgestellt, dass p53-Mutationen durch Regulation des *multidrug resistance protein 1* (MDR1) Resistenzen verursachen können (Chin *et al.* 1992). Zudem können p53-Mutationen Apoptose-Signalwege beeinflussen (Li *et al.* 1998). Durch den Verlust

der Fähigkeit, Apoptose zu initiieren, reagieren p53-mutierte Tumoren vermindert auf Chemo- oder Strahlentherapie (Lee & Bernstein 1993). p53-Mutationen scheinen daher nicht nur durch einen spezifischen Mechanismus Tumorgenese zu induzieren, sondern viel mehr durch eine Kombination aus *Loss-of-function*, dominant-negative und *gain-of-function*-Eigenschaften tumorfördernde Eigenschaften zu vermitteln (Brosh & Rotter 2009).

4.7.3. Regulatoren strahleninduzierter Apoptose – Reaktive Sauerstoffspezies

Ein weiterer wichtiger Mechanismus in der Strahlenantwort von Zellen ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). ROS werden bei der herkömmlichen Strahlentherapie indirekt erzeugt. Bei der ionisierenden Strahlung handelt es sich um energetische Strahlung, die mit Materie wechselwirkt. Wasser in den Zellen ist ein Hauptangriffspunkt der Röntgenstrahlung bei therapeutischen Dosen (Slupphaug 2003). Die dadurch ausgelöste Hydrolyse erzeugt wiederum Radikale. So entstehen aus Wasser Hydrogenperoxid (H_2O_2), Superoxide (O_2^-), Hydroxylradikale (HO^\cdot) und Peroxyle (ROO^\cdot) sowie Alkoxy (RO^\cdot) (Slupphaug 2003). Diese erzeugten Radikale rufen wiederum DNA-Schädigungen hervor, die in der Zelle zu Apoptose führen können. Die Röntgenstrahlen sind somit nur indirekt Auslöser für die DNA-Schäden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Radikalfänger, wie das Thiol N-Acetylcystein (NAC), strahlungsinduzierte Apoptose blockieren kann (Sandstrom *et al.* 1994).

4.7.4. Regulatoren strahleninduzierter Apoptose – *Bystander*-Effekt

Das Phänomen, bei welchem unbestrahlte Zellen, die sich in der Nähe von bestrahlten Zellen befinden, phänotypische Veränderungen durchlaufen, wird als *bystander*-Effekt bezeichnet. *Bystander*-Effekte umfassen unter anderem die Entstehung von Mutationen, die Regulierung von DNA-Reparaturproteinen oder Apoptoseinduktion innerhalb eines Zelltyps. *Bystander*-Apoptose konnte bisher hauptsächlich in Zusammenhang mit löslichen Faktoren beobachtet werden (Lyng *et al.* 2002). Ivanov *et al.* (2010) zeigten, dass *bystander*-Zellen Interleukin 33 (IL-33) sezernieren. Versuche mit IL-33-Inhibitoren führten zu einer Apoptosezunahme von *bystander*-Fibroblasten (Ivanov *et al.* 2010). Fibroblasten haben demnach scheinbar

einen Schutzmechanismus durch autokrine, parakrine IL-33-Sezernierung, welche über den Akt-Signalweg das Überleben der Zelle sichert. *Prise et al.* (1998) beschrieben *bystander*-Apoptose durch direkten Zellkontakt, zeigten jedoch keine mechanistische Untersuchungen.

4.8. Membranbrücken

Beschriebene Mechanismen, durch welche Zellen miteinander kommunizieren können, sind folgende: Parakrine Effekte über sezernierte Moleküle sowie Exosomen und direkte Kommunikation durch benachbarte Zellen über *gap junctions* (*Gerdies et al.* 2013).

Eine neu entdeckte Art des Zellkontaktes wurde von Rustom 2004 beschrieben. Er beobachtete Membranbrücken, die sich von einer Zelle zur anderen bildeten. Durch Verschmelzung der Membranen wurde der Transport von Molekülen und sogar von Zellorganellen festgestellt (*Zhang & Zhang*, 2013). Sie werden als *Tunneling nanotubes* (TNT) bezeichnet. TNT bestehen aus langen, dünnen, Aktin-enthaltenden, zytoplasmatischen Ausläufern, die sich neu ausbilden. Ihnen werden hauptsächlich protektive Eigenschaften zugeschrieben. So konnte das Einschleusen von Mitochondrien apoptotische Zellen vor dem Zelltod retten (*Wang & Gerdies*, 2015), aber auch tumorigenes Potenzial erhalten (*Tan et al.* 2015). Weiterhin konnten TNT im Zusammenhang mit Endothelzellen und Tumorzellen Chemoresistenzen vermitteln (*Pasquier et al.* 2013). Die Ausbildung von TNT beschränkt sich jedoch nicht nur auf *in vitro*-Versuche. In primären Mesotheliomzellen sowie 3D-rekonstruierten Sektionen von humanen Mesotheliom- und Lungenadenokarzinom-Tumoren konnten TNTs nachgewiesen werden (*Lou et al.* 2012; *Ady et al.* 2014). TNT stellen somit eine weitere Art der intrazellulären Kommunikation für die Vermittlung von Zellkontakt-abhängigen Mechanismen dar.

4.9. Tumor-Stroma in der Strahlentherapie

Viele Aspekte des *bystander*-Effekts sind noch ungeklärt und neue Mechanismen der Zell-Zell-Kontakt-Interaktion zeigen neue Forschungsfelder auf. Onkologische Therapien befassen sich daher nicht mehr nur primär damit, die Tumorzellen anzugreifen, sondern zielen auch auf eine Veränderung des Tumor-Stromas ab

4 Einleitung

(Criscitiello *et al.* 2014). Das Tumor-Stroma setzt sich u.a. aus Immunzellen, Endothelzellen und Fibroblasten zusammen (Criscitiello *et al.* 2014).

Bestrahlte Tumorstromazellen sind beteiligt an der Tumorentwicklung und können Therapieerfolge maßgebend beeinflussen. So können durch Bestrahlung pro-angiogene Signale hervorgerufen werden, durch welche Endothelzellen zur Migration angeregt werden und dadurch mehr Vaskularisierung stattfindet (Sofia Vala *et al.* 2010). Zudem können Fibroblasten durch Bestrahlung den Tumor beeinflussen, indem sie die Proliferation, das Wachstum, die Invasion und die Motilität beeinflussen (Kamochi *et al.* 2008; Ohuchida *et al.* 2004). Kamochi *et al.* (2008) zeigten, dass die Ausschüttung von transformierendem Wachstumsfaktor β 1 (TGF- β 1) durch bestrahlte Fibroblasten die Invasivität von unbestrahlten Plattenepithel-Zelllinien erhöhte. Weiterhin können auch Tumor-assoziierte Fibroblasten (*cancer-associated fibroblast*, CAF) durch Bestrahlung die Tumorprogression beeinflussen (Chargari *et al.* 2013). Die Induktion des Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) in bestrahlten CAF führte zur Verstärkung der Tumorgenese von Brustkrebs-Zelllinien (Tyan *et al.* 2011). Die Bestrahlung von normalen Fibroblasten konnte ebenso mit einer Erhöhung der Invasivität von Pankreaskrebs-Zelllinien durch HGF in Verbindung gebracht werden (Ohuchida *et al.* 2004). Es ist ebenfalls bekannt, dass stromale Pankreasfibroblasten, genannt Pankreas-Stellatzellen (PSC), *in vitro* und *in vivo* Strahlenresistenzen und das Überleben von Pankreaskrebszellen durch einen β 1-Integrin-vermittelten Mechanismus hervorrufen (Mantoni *et al.* 2011). In anderen Tumorentitäten, wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkrebs, hatte konditioniertes Medium von bestrahlten Fibroblasten keinen Einfluss auf die Proliferation oder Migration der Tumorzellen (Hellevik *et al.* 2013).

Stromazellen sind maßgeblich am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt und können dadurch die Proliferation und Invasion von Tumoren verändern sowie Resistenz gegenüber Antitumor-Behandlungen vermitteln (Chargari *et al.* 2013; Omary *et al.* 2007). Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist eine dreidimensionale, nicht-zelluläre Struktur, die in allen Geweben vorkommt. Jedes Organ hat eine charakteristische Zusammensetzung der EZM, die schon im Embryonalstadium ausgebildet wird (Bonnans *et al.* 2014). Neben den Funktionen, die aus den physikochemischen Eigenschaften, wie Gewebeintegrität und Elastizität, resultieren, hat die EZM auch für die Gewebekomöostase eine wichtige Bedeutung (Hynes 2009). Eine wesentliche Komponente der EZM ist die Hyaluronsäure.

4.10. Hyaluronsäuresystem

4.10.1. Hyaluronsäure und Hyaluronsäuresynthasen

1934 wurde von Palmer & Meyer eine Uronsäure-ähnliche Struktur beschrieben, die sie aus Glaskörpern von Rinderaugen isolierten. Sie bezeichneten ihre Entdeckung gemäß ihren physikochemischen Eigenschaften als „Hyaluronsäure“, zusammengesetzt aus „hyaloid“ (= glasartig, den Glaskörper betreffend) und Uronsäure. Hyaluronsäure (HA) besteht aus den Disaccharideinheiten N-Acetyl-Glukosamin und Glukuronsäure, die $\beta(1-4)$ bzw. $\beta(1-3)$ verknüpft vorliegen (Weissmann *et al.* 1954). Die sich wiederholenden Disaccharideinheiten bilden ein unverzweigtes Polysaccharid, welches unter physiologischen Bedingungen aus 2.000 bis 25.000 Disacchariden bestehen kann (Toole 2004). Hyaluronsäure nimmt in der Gruppe der Glykosaminoglykane, zu der auch Heparansulfate und Chondroitinsulfate gehören, in vielerlei Hinsicht eine besondere Rolle ein. Normalerweise werden Glykosaminoglykane als Proteoglykane im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet, am Golgi-Apparat assembliert und sezerniert. HA hingegen wird unmodifiziert durch drei transmembranäre Synthasen (HAS) – HAS1, HAS2 und HAS3 – gebildet und in den Extrazellulärraum extrudiert (Vigetti *et al.* 2014). HA wird über Hyaluronidasen – HYAL1 und HYAL2 – abgebaut (Stern & Jedrzejewski 2006). Der HA-Metabolismus ist im Menschen gewebeabhängig. Knorpel erneuern HA alle ein bis drei Wochen (Morales & Hascall 1988), in der Epidermis hingegen wird HA schon in weniger als 24 h erneuert (Tammi *et al.* 1991). HAS werden in Vertebraten und Bakterien exprimiert, mit Ausnahme von Wasserschlängen, Schwämmen, Insekten, Nematoden, Stachelhäutern und Manteltieren (DeAngelis 2002). In Pflanzen ist bisher einzig in Grünalgen natürlich vorkommende HA-Synthese beobachtet worden. Ein Phycodnavirus der Grünalgen besitzt *HAS*-Gen, welches in der frühen Infektionsphase zur Ausbildung von HA-Fasern in Grünalgen führt (Graves *et al.* 1999).

Charakterisiert durch hohe Viskosität, Druckbeständigkeit und Elastizität, kann Hyaluronsäure große Mengen Wasser binden (Sudha & Rose 2014). Neben seinen physikochemischen Eigenschaften kann diese einfache Struktur über die Bindung von Rezeptoren zelluläre Signalwege aktivieren. Wichtige Rezeptoren von Hyaluronsäure sind CD44 und der Rezeptor für HA-vermittelnde Motilität (RHAMM) (Yang *et al.* 1993). Weitere Rezeptoren sind der endotheliale Lymphgefäßrezeptor 1

4 Einleitung

(LYVE-1), der HA-Rezeptor für Endozytose (HARE), die Toll-ähnlichen Rezeptoren 2 (TLR2) und 4 (TLR4), intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), Layilin (LAYN) und HA-bindendes Protein, involviert in HA-Depolarisierung (HYBIP), auch bekannt als KIAA1199 (Banerji *et al.* 1999; Bono *et al.* 2001; Jiang *et al.* 2005; McCourt, *et al.* 1994; Termeer *et al.* 2002; Yoshida *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2000). Über diese Rezeptoren beeinflusst HA zelluläre Funktionen wie Migration, Proliferation, Überleben und Apoptose (Vigetti *et al.* 2014). Eine Übersicht über das HA-System ist in Abbildung 1 dargestellt.

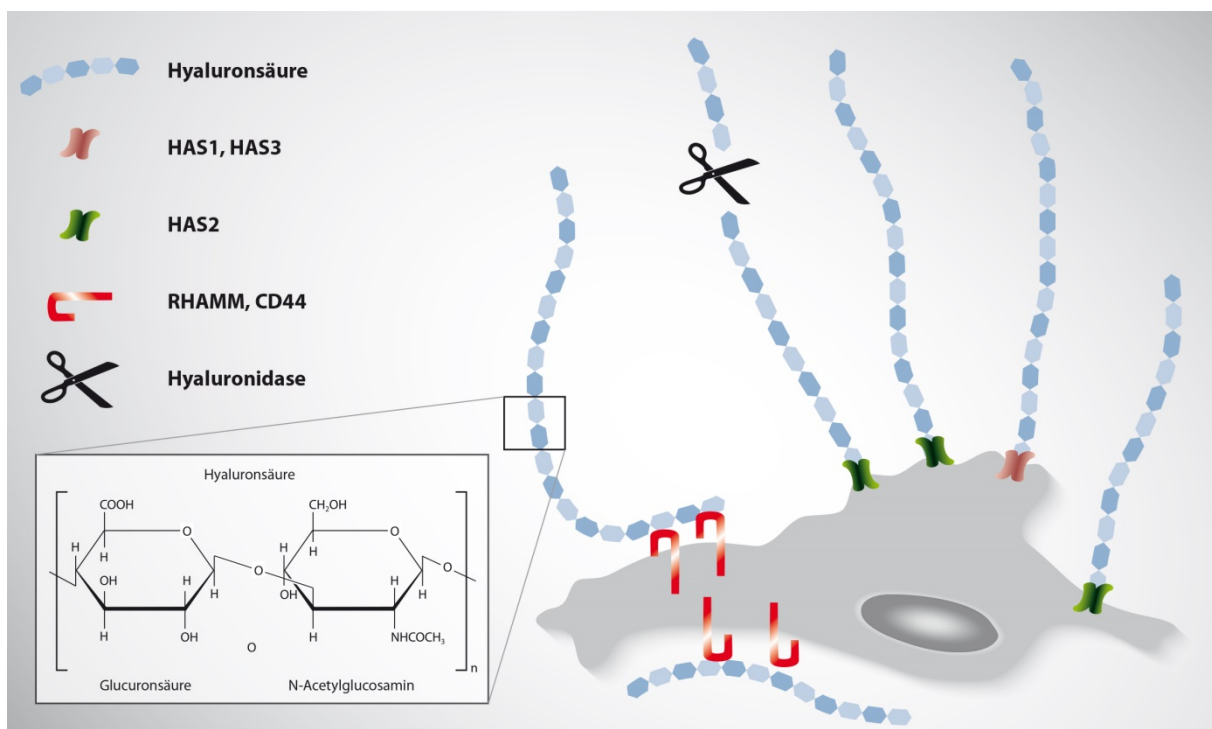


Abbildung 1: Übersicht über das HA-System. HA besteht aus repetitiven Einheiten N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure. Sie wird über HAS1, HAS2 und HAS3 in den Extrazellularraum extrudiert. Die Hyaluronidasen HYAL1 und HYAL2 metabolisieren HA. Über die Bindung an seine Rezeptoren können zelluläre Signalwege aktiviert werden.

4.10.2. Das Hyaluronsäuresystem und ionisierende Strahlung

Bisher ist nur wenig über die Einflüsse und Effekte des HA-Systems im Kontext der Bestrahlung bekannt. HA wird durch ionisierende Strahlung und die entstandenen radikalen Sauerstoffspezies depolymerisiert (Shin *et al.* 2007). So konnten erhöhte HA-Mengen in bronchoalveolärer Lavage bei Bestrahlung der Lunge und im bestrahlten Darm gemessen werden (Riehl *et al.* 2012). Eine externe Zugabe von HA konnte zudem die Strahlenschäden *in vitro* in humanen Lymphoma-Zelllinien, aber auch *in vivo* im Mäusedarm reduzieren (Chen *et al.* 2005; Riehl *et al.* 2012). Durch

eine Interaktion mit CD44 verstärkte HA die DNA-Reparatur in bestrahlten humanen Lymphomzellen (Chen *et al.* 2005). In Mäusen, die mit einer Ganzkörperdosis von 12 Gy bestrahlt wurden, erwies sich HA durch einen TLR4-abhängigen Mechanismus als radioprotektiv, indem über Cyclooxygenase 2-(COX-2)-Modulation die Migration von mesenchymalen Stammzellen angeregt wurde (Riehl *et al.* 2012). Zudem konnte in einem Fibrose-Modell, bei welchem Lungenfibrose durch Bestrahlung hervorgerufen wird, festgestellt werden, dass durch Regulation von HAS2 und HYAL2 hochmolekulare HA in der frühen Phase vorliegt und durch den späteren Abbau in Form von HA-Fragmenten zu einem Umbau der EZM beiträgt (Li *et al.* 2000). Die Induktion von *HAS2*-Expression durch Bestrahlung vermittelte in Kolonkarzinom-, Lungenkrebs- und Osteosarkom-Zelllinien Radioresistenz, die durch knockdown-Versuche von *HAS2* aufgehoben werden konnten (Shen *et al.* 2014). Das HA-System scheint demnach durch vielfältige Mechanismen eine Rolle in der Strahlenantwort zu spielen.

4.10.3. Rezeptor der Hyaluronsäure-vermittelten Motilität

Der Hyaluronsäure-Rezeptor RHAMM wurde als löslicher Faktor im Überstand von subkonfluenten Fibroblasten entdeckt und aus mesenchymalen Zellen kloniert (Hardwick *et al.* 1992; Turley 1982). Wie sich später herausstellte, ist RHAMM an der Zellmembran, im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert (Assmann *et al.* 1998). RHAMM scheint ubiquitär in allen Zelltypen vertreten zu sein (Turley 1992). Nicht-teilende Zellen zeigen nur eine geringe *RHAMM*-Expression, die durch Stimulation mit Zytokinen angeregt werden kann (Korkes *et al.* 2013). Zudem ist RHAMM in transformierten Zellen sowie in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert (Augustin *et al.* 2015; Cheng, Sato *et al.* 2015; Crainie *et al.* 1999; Gust *et al.* 2009; Hatano *et al.* 2013; Ishigami *et al.* 2011; Niedworok *et al.* 2013; Tilghman *et al.* 2014; Tzankov *et al.* 2011; Wang *et al.* 1998; Zlobec *et al.* 2008). Das *RHAMM*-Gen ist auf dem Chromosom 5q33.2 lokalisiert. Faktoren, die eine *RHAMM*-Expression induzieren, sind TGF β -1, der Rezeptor für Makrophagen-stimulierendes Protein (Recepteur d'Origine Nantais, RON) und die Signalwege von Yes-assoziiertem Protein-(YAP) und Hippo (Manzanares *et al.* 2007; Park *et al.* 2012; Wang *et al.* 2014a). Reduziert wird RHAMM durch Tumorsuppressor p53 und BRCA1 (Joukov *et al.* 2006; Sohr & Engeland 2008). RHAMM bindet über positiv geladene Aminosäure-

4 Einleitung

Cluster des Carboxylendes an HA (Yang *et al.* 1993). Das Protein besteht in seiner Tertiärstruktur aus *Leucin-Zipper*-Domänen und *coiled-coil*-Strukturen, die darauf schließen lassen, dass RHAMM mit sich selbst assoziieren und als Dimer oder Trimer vorliegen kann (Tolg *et al.* 2014). Analysen in *Knock-out*-Mäusen zeigten, dass RHAMM weder für die Embryogenese noch für die Homöostase in erwachsenen Tieren benötigt wird (Tolg *et al.* 2003), sondern vor allem in pathologischen Zuständen eine besondere Rolle spielt. RHAMM hat abhängig von seiner Lokalisation in der Zelle unterschiedliche Funktionen.

Durch alternatives Spleißen kann RHAMM in vier Isoformen vorkommen (NCBI, Gen-ID: 3162; NM_001142556.1, NM_0122485.2, NM_012484.2 und NM_001142557.1; Abbildung 2), bei denen vermutet wird, dass sie zelltypspezifisch exprimiert werden (Cheung *et al.* 1999). So fördert RHAMMv3 beispielsweise in einem Mausmodell die Bildung von Metastasen bei Leberkrebs (Du *et al.* 2011).

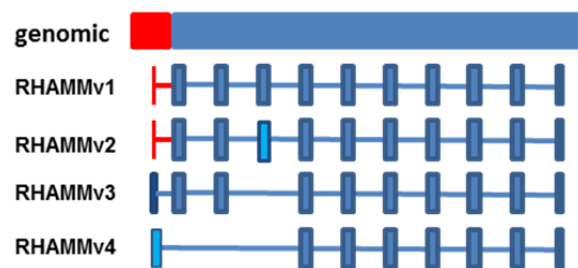


Abbildung 2: Übersicht der *RHAMM*-Isoformen. *RHAMM* (NCBI, Gene ID: 3162) kann durch alternatives Spleißen in vier Isoformen vorkommen. *RHAMMv1* (NM_001142556.1) ist die längste Variante und unterscheidet sich nur in der Deletion einer Aminosäure von *RHAMMv2* (NM_0122485.2). *RHAMMv3* (NM_012484.2) fehlt, Exon 4 und *RHAMMv4* (NM_001142557.1) besitzen einen alternativen Transkriptionsstart, wodurch ebenfalls Exon 2, 3 und 4 fehlen.

Als membranständiger Rezeptor interagiert RHAMM mit dem Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktorrezeptor (PDGFR) (Zhang *et al.* 1998), TGF β R-1 (Park *et al.* 2012), CD44 (Nikitovic *et al.* 2013), dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) in Interaktion mit CD44 (Du *et al.* 2011), dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2-Rezeptor (FGF-2R) (Savani *et al.* 2001) und RON (Manzanares *et al.* 2007). Extrazellulärregulierende Kinase 1 und 2 (ERK1,2) vermitteln Zellmotilität bei der Progression von Brustkrebs (Hamilton *et al.* 2007) sowie zelluläres Überleben (Maxwell *et al.* 2004). Als Membranrezeptor fungiert RHAMM ebenfalls in der Zellteilung. So hat eine Rezeptorblockade zu einer reduzierten Zellzyklusprogression geführt, weil RHAMM mit HAS2 maßgeblich an dem Abrunden der Zellen während

4 Einleitung

der Zellteilung beteiligt ist (Mohapatra *et al.* 1996). Durch die Interaktion mit Mikrotubuli-assoziiertem Proteinhomolog (TPX2) und der Aktivierung von Aurorakinase A (AURKA) beeinflusst intrazelluläres RHAMM die Spindel-Integrität (Chen *et al.* 2014). TPX2 und AURKA können durch ionisierende Strahlung reguliert werden (Bhatia *et al.* 2010). Durch die Interaktion von RHAMM mit TPX2 und AURKA könnte demnach auch RHAMM durch ionisierende Strahlung beeinflusst werden. Bislang wurden jedoch keine Forschungsergebnisse veröffentlicht, die RHAMM im Kontext von Strahlentherapie untersuchten.

4.11. Zielsetzung

Aufgrund von stets steigenden Tumorneuerkrankungen nimmt die Erforschung effektiver Behandlungsstrategien für die Krebstherapie einen hohen Stellenwert ein. Neben der chirurgischen Entfernung und der Chemotherapie ist die Strahlentherapie ein fester Bestandteil der onkologischen Therapie. Trotz intensiver Forschung besteht kein gesicherter Therapieerfolg. So gibt es Tumore, die nur schlecht auf Bestrahlung ansprechen oder durch Resistenzmechanismen Rezidive aufweisen. Aktuelle Forschungsvorhaben beschäftigen sich daher mit der Entwicklung von Substanzen, die in Kombination mit Strahlentherapie eingesetzt werden können. Ziel dieser Arbeit war es, neue Mechanismen, die die Strahlensensitivität bestimmen, zu identifizieren, um nachfolgend über unterschiedliche pharmakologische Interventionen die Strahlensensitivität in Tumorzellen zu erhöhen. Das HA-System ist im Kontext der Strahlentherapie bislang nur wenig erforscht. Aufgrund der vielfältigen pathologischen Einflüsse von HA behandelt die vorliegende Arbeit zunächst die Charakterisierung des HA-Systems im Kontext von Tumorbestrahlung. Im Hinblick auf die zelluläre Strahlenantwort wurde die Expression und Funktion der Komponenten des HA-Systems nach Bestrahlung in verschiedenen Tumormodellen untersucht. Da Fibroblasten eine Hauptquelle von HA sind, sollten zudem die Einflüsse des stromalen HA-Systems untersucht werden. Hierfür wurde ein Kokultur-Versuchsdesign entwickelt bei welchem die Fibroblasten und Tumorzellen einzeln bestrahlt und nach anschließender Kokultur untersucht wurden. Folgende übergeordnete Fragestellungen sollten hierbei untersucht werden:

- Welche Rolle spielt das HA-System in bestrahlten Mammakarzinom-Zelllinien und welche Effekte bewirkt die pharmakologische Modulation von HA?
- Welche Wirkung entfalten bestrahlte Fibroblasten als stromale Komponente und deren HA-System auf bestrahlte Ösophaguskarzinomzellen?

5. Material und Methoden

5.1. Zellkultur

5.1.1. Versuchsaufbau

In vitro-Versuche wurden unter Standardkulturbedingungen mit 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 (beide von CLS, Eppelheim) sowie humane Vorhautfibroblasten (NHDF, PromoCell, Heidelberg) wurden in *Dubecco's* modifiziertem *Eagle's* Medium (DMEM)-4,5 g/L Glukose (Gibco, Carlsbad) mit 10 % fötalem Kälberserum (*fetal bovin serum*, FBS) (Gibco, Carlsbad) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Carlsbad) kultiviert. Die Ösophagusplattenepithelkarzinomzelllinien (ESCC) KYSE410 (DSMZ, Braunschweig) und OSC-1 (Sarbia *et al.* 1997) wurden in *Roswell Park Memorial Institut*-Medium (RPMI) 1640 Medium GlutaMAX™ (Gibco, Carlsbad) mit 10 % FBS (Gibco, Carlsbad) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Carlsbad) gehalten. Passagieren der Zelllinien erfolgte durch Waschen der Zellen mit Phosphat-gepuffertem Puffer (PBS) und anschließendem Ablösen der Zellen mit einer 0,5 %-igen Trypsin/EDTA-(TE)-Lösung (Gibco, Carlsbad). Die Trypsin-Aktivität wurde im Anschluss mit dem 5-fachen Volumen Vollmedium abgestoppt und die Zellen für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden nachfolgend in frischem Medium resuspendiert und ausgesät. Die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden für Experimente in einer Dichte von 3.000 Zellen pro cm² in 2 % FBS ausgesät. 24 h nach der Aussaat wurden sie bestrahlt (s. 2.2) und weitere 48 h später auf phänotypische Veränderungen untersucht.

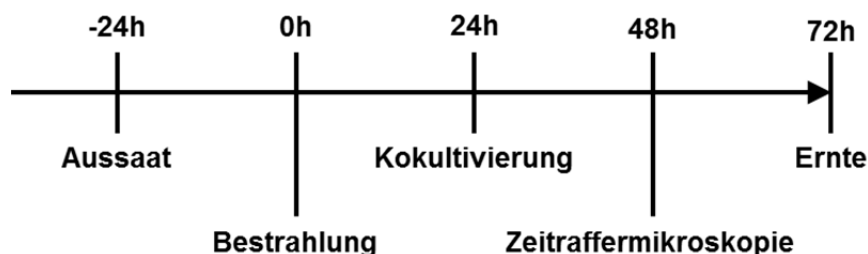


Abbildung 3: Experimentelles Design für die Kokultivierung von Tumor- und Stromazellen.

5 Material und Methoden

NHDF und ESCC wurden in einer Dichte von 12.500 NHDF pro cm^2 und 5.000 KYSE410 pro cm^2 in Vollmedium als Monokulturen ausgesät (Abbildung 3). Zur Untersuchung des Unterschieds zwischen bestrahlten und unbestrahlten NHDF auf den Phänotyp der Tumorzellen wurden die Zellen zunächst als Monokultur gehalten. 24 h nach der Aussaat erfolgte die Bestrahlung der Zelllinien bzw. die Scheinbehandlung der Kontrollzellen. Nach weiteren 24 h wurden die NHDF durch Trypsinierung abgelöst und zu den KYSE410 gegeben. Die Kokultur wurde in RPMI 1640 Medium GlutaMAXTM (Gibco, Carlsbad) mit 0 % FBS für weitere 48 h kultiviert und anschließend analysiert.

Indirekte Kokulturen wurden mit Hilfe von Einsätzen (*Transwells*) durchgeführt. Hierbei wurden NHDF in die Einsätze (Corning, Corning) eingebracht und zum Zeitpunkt der Kokultur in die mit den Tumorzellen bestückten Löcher eingesetzt, gemäß Abbildung 3. Auf diese Weise wurde ein direkter Zellkontakt unterbunden. Jedoch erfolgte weiterhin ein Austausch von löslichen Faktoren über eine semipermeable Membran am Boden der Einsätze.

Die Durchführung der Überstandsversuche erfolgte analog des Schemas in Abbildung 4. Hierfür wurde das konditionierte Medium von NHDF 72 h nach Bestrahlung oder Scheinbehandlung abgenommen und abzentrifugiert. Die bestrahlten und scheinbehandelten Tumorzellen wurden mit konditioniertem NHDF-Medium 24 h nach ihrer Bestrahlung für weitere 48 h behandelt und anschließend analysiert.

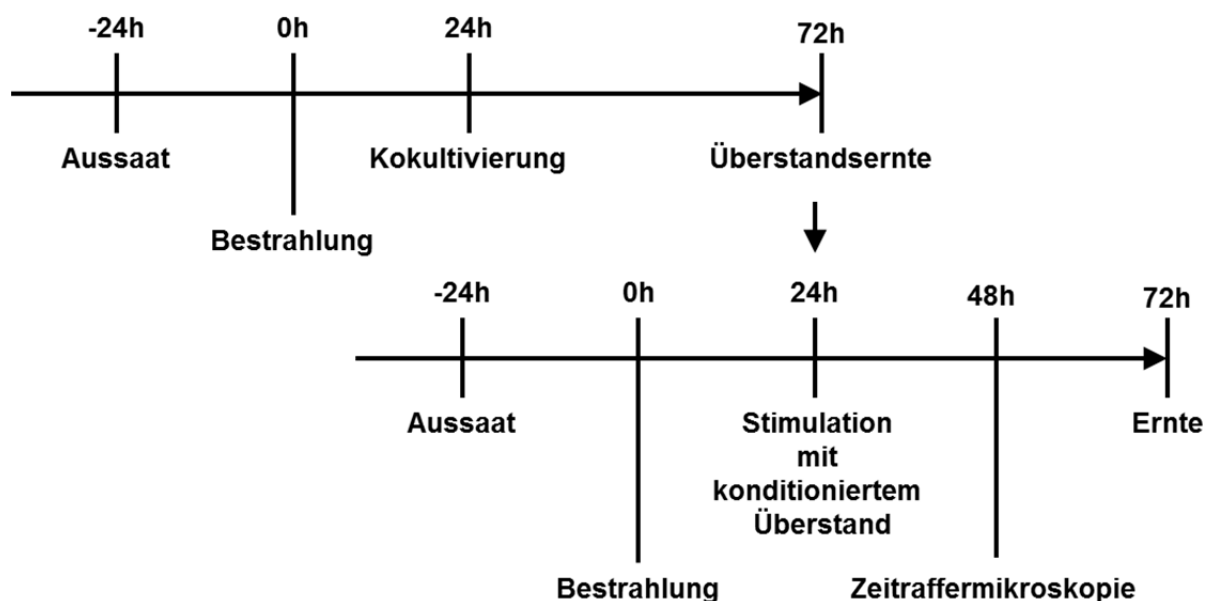


Abbildung 4: Experimentelles Design zur Durchführung der Überstandsversuche.

5.1.2. Stimulationen der Zellen

Eine Übersicht über die verwendeten Substanzen ist in Tabelle 1 gezeigt. 4-Methylumbelliferon (4-MU) wurde 24 h vor der Bestrahlung eingesetzt. Die Stimulation mit Elesclomol erfolgte 24 h nach der Aussaat. N-Acetylcystein (NAC) und Natriumselenit (*sodium selenite*, SSE) wurden als Radikalfänger der reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) verwendet. Da NAC sehr instabil ist, wurde es 4 h vor der Bestrahlung eingesetzt, SSE dagegen 24 h vor der Bestrahlung. Beim Ansetzen der Kokultur wurde ebenfalls mit NAC und SSE stimuliert. Cytochalasin B (CB) inhibiert die Polymerisation von Aktin und wird in geringen Konzentrationen für die Inhibierung von *tunneling nanotubes* (TNTs) genutzt (Bukoreshtliev *et al.* 2009). Pifithrin- μ (PFT- μ) blockiert selektiv die p53-Translokation zum Mitochondrium und kann somit gezielt den mitochondrialen Zweig des p53-Signalwegs inhibieren (Strom *et al.* 2006). Die Zellen wurden 24 h nach Ansetzen der Kokultur mit CB und PFT- μ stimuliert.

Tabelle 1: Stimulanzienübersicht.

Substanz	Funktion	Endkonz.	Hersteller
4-Methylumbelliferone (4-MU)	HAS-Inhibition (Lokeshwar <i>et al.</i> 2010)	300 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis
Elesclomol (STA-4783)	ROS-Induktion (Yadav <i>et al.</i> 2013)	100 nM	Selleckchem, München
N-Acetylcystein (NAC)	ROS-Fänger (Sandstrom <i>et al.</i> 1994)	5 mM	Merck, Billerica
Natriumselenit (<i>sodium selenite</i> , SSE)	ROS-Fänger (Wang <i>et al.</i> 2013)	200 nM	Sigma-Aldrich, St. Louis
Cytochalasin B (CB)	TNT-Inhibition (Bukoreshtliev <i>et al.</i> 2009)	100 nM	Santa Cruz Biotechnology, Dallas
Pifithrin- μ (PFT- μ)	Inhibition der p53 Translokation zum Mitochondrium (Strom <i>et al.</i> 2006)	100 nM	Sigma-Aldrich, St. Louis

5.1.3. Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte im Labor für Molekulare Radioonkologie unter der Leitung von Prof. Dr. Reiner Jänicke. Das Bestrahlungsgerät Xstrahl RS225 (Gulmay Medical, Camberley) wurde mit 150 kV und 15 mA und einem 0,2 mm Kupferfilter zur

Bestrahlung von Zellkulturplatten genutzt. Die Kultivierungsplatten wurden zentriert in die temperierbare Inkubationseinheit gestellt und für die Bestrahlung von 2 Gy für 2 min 54 sec bestrahlt. Bei den Kokultivierungsversuchen wurde mit 200 kV und 15 mA und einem 0,2 mm Kupferfilter zur Bestrahlung von 2 Gy (1 min 57 sec) und 10 Gy bei Kokultivierung mit OSC-1 (7 min 35 sec) angewendet.

5.1.4. Transfektion

Das Einbringen kurzer interferierender RNA (siRNA) erfolgte mittels Lipofectamin[®] RNAiMAX (Life Technologies, Carlsbad). Zunächst wurden Lipofectamin[®] RNAiMAX und siRNA zum Äquilibrieren 25 min in serumfreiem sowie antibiotikumfreiem Medium vorinkubiert. Als Kontrolle diente AllStar Negative Control siRNA in gleicher Konzentration. Der entstandene Lipofectamin[®]-siRNA-Komplex wurde anschließend in eine Lochung einer 12-er Lochplatte eingebracht und die Zellen in 1 mL antibiotika- und serumfreiem Medium hinzugegeben. Die Transfektionseffizienz wurde mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) untersucht und für ausreichend erachtet, wenn eine Reduktion der RNA-Expression von mindestens 50 % erreicht wurde. Eine ausreichende Transfektionseffizienz wurde in jeder Zelllinie bei allen untersuchten Bedingungen erreicht. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der Transfektionsbedingungen für die verwendeten Zelllinien. Bei Versuchen mit siRNA-Transfektionen fand die Bestrahlung 24 h nach der Transfektion statt. Bei Transfektionen mit siTP53 wurde die Bestrahlung 48 h nach der reversen Transfektion durchgeführt, da p53 somit zum Zeitpunkt der Bestrahlung ausreichend herabreguliert war. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die verwendeten siRNAs.

Tabelle 2: Übersicht der Transfektionsbedingungen für die verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Endkonzentration der siRNA	Eingesetztes Lipofectamin[®] pro mL
MCF-7	10 nM	2 µL
MDA-MB-231	10 nM	2 µL
NHDF	50 nM	3 µL

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten siRNAs.

mRNA	siRNA oder Zielsequenz	Firma
siKon	AllStar Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden
RHAMMpan	Hs_HMMR_9 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden
HAS2	Hs_HAS2_2 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden
HAS2	Hs_HAS2_3 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden
HAS2	Hs_HAS2_4 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden
TP53	Hs_TP53_7 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden
TP53	Hs_TP53_8 FlexiTube siRNA	Qiagen, Hilden
RHAMMv1	AATCAAAGAAGGAATCTCAAA	Sigma-Aldrich, St. Louis
RHAMMv2	AAGTCTTCGGAATCAAAGGAA	Sigma-Aldrich, St. Louis
RHAMMv1/2	AAAGAGATTCGTGTTCTTCTACA	Sigma-Aldrich, St. Louis
RHAMMv1/2.2	AAGAGATTCGTGTTCTTCTACAG	Sigma-Aldrich, St. Louis
RHAMMv3	AAAGATTCGTGTTCTTCTACAGG	Sigma-Aldrich, St. Louis
RHAMMv3.2	AAGATTCGTGTTCTTCTACAGGA	Sigma-Aldrich, St. Louis
RHAMMv1/2/3	AAAGTTAAGTCTTCGGAATCAAA	Sigma-Aldrich, St. Louis
RHAMMv4	AATGACCCTTCTGATTCGTGT	Sigma-Aldrich, St. Louis

5.1.5. Sub-G1-Messung

Ein Kennzeichen von Apoptose ist die internukleosomale DNA-Fragmentierung. Durch die Messung des DNA-Gehalts mit dem DNA-interkalierenden Agens Propidiumiodid (PI) kann somit nicht nur der Zellzyklus analysiert werden, sondern auch die Anzahl an hyploiden Zellen, die sich im Zellzyklusdiagramm in der sub-G1-Region des PI-Histogramms befinden, bestimmt werden. Für die sub-G1-Messung wurden die Zellen in 6-er Lochplatten ausgesät und entsprechend behandelt. 48 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen durch TE-Inkubation abgelöst. Nach anschließendem einmaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen in 75 µL Lysepuffer, nach Nicoletti *et al.* (1991) sowie 25 µL Guava[®] Cell Cycle Reagent (Millipore, Billerica) aufgenommen und in dem Durchflusszytometer EasyCyte 5 (Millipore, Billerica) vermessen. Unter Zuhilfenahme der InCyte Software (Millipore, Billerica) wurden 10.000 Events in der Population der *forward scatter* (FCS)/ *side scatter* (SSC) analysiert. Dubletten wurden durch das Setzen eines weiteren Gates in Höhe der roten Fluoreszenz (RedH)/Fläche der roten Fluoreszenz (RedA) ausgeschlossen. Der rote Kanal detektiert Fluoreszenzen von 661/15 nm. Das erhaltene Histogramm wurde auf die Anzahl der Zellen untersucht, die sich in der sub-G1-Phase befinden. Exemplarische Histogramme wurden mit Kaluza Software Version 1.3 (Beckman Coulter, Krefeld) erstellt (Abbildung 5).

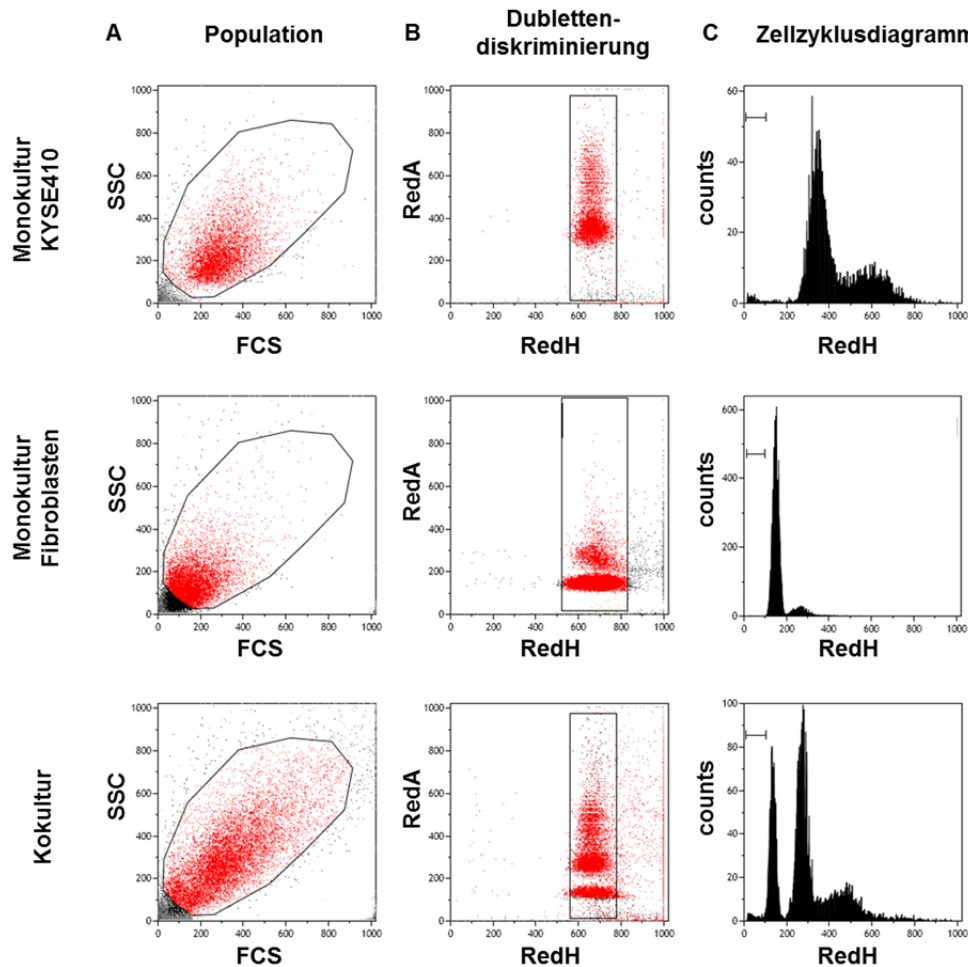


Abbildung 5: Punktdiagramme und Histogramme in der durchflusszytometrischen Messung von sub-G1. Darstellung exemplarischer Punktdiagramme und Histogramme von Monokulturen KYSE410 (obere Zeile), NHDF (mittlere Zeile) sowie einer Kokultur aus beiden Zelllinien (untere Zeile). A, Die Bestimmung der Größe und Granularität der gemessenen Events wird durch das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC) bestimmt. Durch Auftragung von FSC gegenüber SSC kann die Population der Zellkerne bestimmt werden. B, Die Population aus A wurde selektiert und die Höhe gegen die Fläche des roten Fluoreszenzsignals aufgetragen, um die Zelldubletten auszuschließen. C, Anschließend wurden die selektierten Zellen in einem Histogramm mit Auftragung der linearen roten Fluoreszenz gezeigt.

5.2. Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit TE abgelöst. Zellen, deren Zellmembran durch apoptotische Vorgänge nicht mehr intakt vorliegt, können durch eine Färbung mit Trypanblau markiert werden und färben sich blau. Intakte Zellen können den Farbstoff nicht aufnehmen und bleiben farblos. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine 1:1-Lösung, bestehend aus der Zellsuspension und Trypanblau (Invitrogen, Carlsbad), hergestellt. 10 μ L der gefärbten Zellsuspension wurden in eine Zählkammer (Cell Counting Chamber Slide, Invitrogen, Carlsbad)

überführt und die Lebendzellzahl wurde automatisch durch den Zellzähler *Countess Automated Cell Counter* (Invitrogen, Carlsbad) bestimmt.

5.3. Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden die Zellen mit Carboxyfluoresceinsuccimidylester (CFSE, Life Technologies, Carlsbad) analog Quah *et al.* (2007) gefärbt. CFSE wird von intrazellulären Esterasen in ein fluoresziertes Molekül umgebaut, welches über stabile Amidbindungen zu Proteinen in der Zelle verbleibt. Der fluoreszierende Farbstoff verteilt sich bei jeder Zellteilung gleichmäßig in die Tochterzellen, sodass die Fluoreszenzintensität mit jeder Zellteilung halbiert wird (Deleyrolle *et al.* 2012). 1 Mio. Zellen wurden in 0,1 % FBS in PBS aufgenommen und mit einer Endkonzentration von 10 μ M CFSE für 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Färbung wurde mit dem 5-fachen Volumen an Vollmedium durchgeführt mit anschließendem 3-maligen Waschen der Zellen mit PBS. Die CFSE-markierten Zellen wurden anschließend ausgesät und – wie unter 5.1.1 beschrieben – behandelt. Zum Analysezeitpunkt wurden die Zellen durch TE abgelöst, in 100 μ L DMEM-4,5 g/L Glukose (Gibco, Carlsbad) mit 10 % fötalem Kälberserum (*fetal bovin serum*, FBS) (Gibco, Carlsbad) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Carlsbad) aufgenommen und durch Zuhilfenahme des Guava EasyCyte 5 Durchflusszytometers (Millipore, Billerica) im grünen Kanal (GRN) vermessen. Jeweils 10.000 Zellen wurden mit der Software InCyte (Millipore, Billerica) analysiert und das gemittelte Fluoreszenzsignal gemessen. Je mehr Zellteilungen stattgefunden haben, desto geringer ist das Fluoreszenzsignal. Der Anschaulichkeit halber wurde daher das Fluoreszenzsignal in reziproker Auftragung gezeigt.

5.4. Softagar-Assay

Ein Kennzeichen der malignen Transformation ist adhäsionsfreies Wachstum (Jinka *et al.* 2012). Der Softagar-Assay kann eben diese Eigenschaft untersuchen, indem Zellen in Agar ausgesät werden, wodurch ihnen die Möglichkeit genommen wird, am Boden anzuhafte (Borowicz *et al.* 2014). Zur Durchführung des Softagar-Assays wurden 12-er Lochplatten mit 600 μ L 0,6 % Agar (Carl Roth, Karlsruhe) beschichtet.

5 Material und Methoden

Dabei wurde 1,2 %-ige Agarose 1:1 mit 2-fach DMEM (Sigma-Aldrich) und 10 % FCS verdünnt, erhitzt und flüssig in die Lochung gegossen. Zur Herstellung des 0,3 %-igen Agars wurde 0,6 %-ige Agarose 1:1 mit 2-fach DMEM (Sigma-Aldrich) und 10 % FCS angesetzt und warm gehalten. Die MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurden 48 h nach der Bestrahlung mit TE abgelöst und gezählt (Abschnitt 5.2). 1.250 Zellen wurden in den warmen 0,3 % Agar gegeben und vorsichtig auf die Löcher der vorbereiteten 12-er Lochplatten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Zellen mit 1 mL DMEM überschichtet. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Nach 14 Tagen wurde das Medium abgesaugt und die Kolonien mit 500 µL 0,5 mg/mL *p*-Iodonitrotetrazoliumviolett (INT) (Sigma-Aldrich, St. Louis) gefärbt und quantifiziert.

5.5. Proteinexpressionsanalyse

Die Zellen wurden zum Analysezeitpunkt mit kaltem PBS gewaschen und in RIPA-Puffer mit Proteinase- und Phosphatase-Inhibitormix lysiert. Das Lysat wurde anschließend mit Laemmli-Puffer 10 min bei 95 °C aufgeköcht (Laemmli 1970). Die Proteine wurden durch eine SDS-PAGE bei 120 V aufgetrennt und mit einem Semidry-Blot-System (Pierce, Erlangen) bei 14 V und 200 mA pro Membran auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare, Buckinghamshire) überführt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Nitrozellulosemembranen für 1 h in 5 % Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis) in Tris-gepuffertem Puffer mit Tween 20 (TBST) bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde der entsprechende Erstantikörper (Tabelle 4) in 10 mL 2,5 % BSA in TBST auf die Membran aufgebracht. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht wurden die Nitrozellulosemembranen mit TBST gewaschen und mit entsprechendem Zweitantikörper, gekoppelt mit Infrarotfarbstoffen (Tabelle 5), für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Analyse wurden die Nitrozellulosemembranen mit dem Odyssey Infrared Imaging System (*application software version 3.0*, Li-Cor, Bad Homburg) detektiert und quantifiziert.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Isotyp	Best.-Nr.	Hersteller
RHAMM, CD168 [EPR4055]	1:1000	Kaninchen	GTX62573	GeneTex, Irvine
RHAMM, CD168 [EPR4055]	1:1000	Kaninchen	ab108339	Abcam, Cambridge
p53 [DO-1]	1:1000	Maus	OP-43	Calbiochem, Billerica
PARP [46D11]	1:1000	Kaninchen	#9532	CellSignaling Technologies, Danvers
p38	1:1000	Kaninchen	#9212	CellSignaling Technologies, Danvers
pp38 (Thr180/Tyr182)	1:1000	Kaninchen	#9211	CellSignaling Technologies, Danvers
β-Aktin	1:1000	Maus	A5316	Sigma-Aldrich, St. Louis
β-Tubulin	1:10000	Maus	T7816	Sigma-Aldrich, St. Louis
RHAMM, CD168 [EPR4055]	1:1000	Kaninchen	ab108339	Abcam, Cambridge

Tabelle 5: Liste der verwendeten Sekundärantikörper für Western Blots.

Antikörper	Verdünnung	Isotyp	Best.-Nr.	Hersteller
IRDye® 800CW anti-mouse IgM	1:10000	Ziege	925-32280	LI-COR biotechnology, Bad Homburg
IRDye® 800CW anti-rabbit IgG	1:10000	Ziege	926-32211	LI-COR biotechnology, Bad Homburg
IRDye® 680LT anti-mouse IgM	1:10000	Ziege	926-68080	LI-COR biotechnology, Bad Homburg
IRDye® 680RD anti-rabbit IgG	1:10000	Ziege	926-68071	LI-COR biotechnology, Bad Homburg

5.6. Zeitraffer-Mikroskopie

5.6.1. Bestimmung und Quantifizierung von toten Zellen

Zur Untersuchung und Quantifizierung des zellulären Phänotyps wurden 24 h nach dem Ansetzen der Kokulturen mikroskopische Zeitraffer-Aufnahmen (10x Objektiv Carl Zeiss, Axio Observer.Z1, Oberkochen) gemacht. Hierzu wurde über einen Zeitraum von weiteren 24 h alle 10 min ein Bild aufgenommen. Die Beibehaltung der

5 Material und Methoden

Standardkultivierungsbedingungen wurde durch Verwendung einer das Mikroskop umfassenden Inkubationskammer (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre) gewährleistet.

Die Differenzierung zwischen den Zelllinien erfolgte durch phänotypische Unterschiede und die Anfärbung der Tumorzellen mittels fluoreszenzmarkierter Anti-EpCam-Antikörper (Biolegend, San Diego). Vorkommnisse bei welchen sich Tumorzellen abrundeten, apoptotische Körperchen bildeten und anschließend abschwammen, wurden gezählt (siehe Abbildung 6) und auf die anfängliche Tumorzellzahl pro Video bezogen (Zen 2012 blue edition, Carl Zeiss, Oberkochen). Je Probe wurden drei Videos aufgenommen und die Ergebnisse gemittelt.

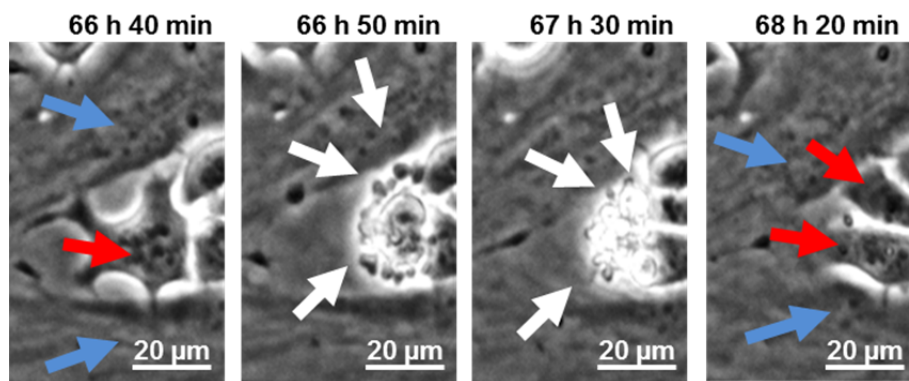


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung des Absterbens einer Tumorzelle im Zeitverlauf. Gezeigt ist die Bildabfolge einer Kokultur aus bestrahlten Fibroblasten (blaue Pfeile) mit bestrahlten Tumorzellen (rote Pfeile) über den Zeitraum von 1 h 30 min. Die weißen Pfeile deuten auf apoptotische Körperchen. Nach 68 h 20 min ist die absterbende Tumorzelle nicht mehr sichtbar.

5.6.2. Zelluläre Migration

Das Migrationsverhalten der Zellen wurde durch Zeitraffer-Mikroskopie untersucht. Es wurde die Inkubationskammer (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre) verwendet um die Standardkultivierungsbedingungen der Zellkultur beizubehalten. 24 h nach der Bestrahlung wurden Bilder mit dem 10x Objektiv am Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen) alle 30 min für 24 h aufgenommen. Drei Videos je Probe und acht Zellen pro Video wurden anschließend mittels ImageJ (Version 1.47, Wayne Rasband, National Institut of Health, USA) sowie dem Plug-In „manual tracking plugin“ (Fabrice Cordeli, Institut Curie, Orsay, Frankreich) analysiert und mit dem Chemotaxis und Migrations-Tool von Ibidi (Gerhard Trapp, Martinsried, Deutschland) ausgewertet.

5.7. mRNA-Expressionsanalyse

Für die Boten-RNA-(mRNA)-Expressionsanalyse wurden die Zellen mit 1 mL peqGOLD TriFast (PeqLab, Erlangen) 10 min lysiert. Durch die Zugabe von 200 µL Chloroform, 5-maliges kurzes Vortexen und 15-minütiger Zentrifugation bei 21.000 x g reichert sich die RNA in der oberen wässrigen Phase an. Desoxyribonukleinsäure (DNA) lagert sich in der milchigen Intermediärphase ein, während Proteine in der organischen unteren pinken Phase verbleiben. Zur Isolation der Ribonukleinsäuren (RNA) wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen. Zur Fällung der RNA wird anschließend Isopropanol im Verhältnis 1:1 zugesetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde für 45 min bei 4 °C und 21.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die im Pellet befindliche RNA mit 75 % (v/v) Ethanol (VWR, Langenfeld) gewaschen. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 21.000 x g wurde das resultierende RNA-Pellet in 20 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration mittels NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Waltham) bestimmt. RNA, welche ein 260/280 nm Absorptionsverhältnis (Maß für die RNA-Reinheit) zwischen 1,8–2 sowie ein 260/230 nm Absorptionsverhältnis (Maß für Proteinverunreinigungen) um 2 zeigte, wurde weitergehend in kodierende Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben.

Die Primer wurden Exon-übergreifend designt. Hierfür wurden mit Hilfe der Primer 3 Plus Version 3.0.0 (Rozen & Skaletsky 2000) Primersequenzen gewählt, sodass die resultierten PCR-Produkte zwischen 70 und 150 Basen groß wurden. Die Primersequenzen waren 20 Basen lang und ihre Schmelztemperatur lag zwischen 59 °C und 61 °C, wobei Primerpaare einen maximalen Schmelztemperaturunterschied von 1 °C aufwiesen. Der Guanin-Cytosin-Anteil lag optimalerweise bei 55 %. Die designten Primer wurden mit dem nationalen Center für Biotechnologische Information (NCBI) C++ Toolkit *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Gertz 2005) überprüft.

Das Umschreiben von 1 µg RNA in cDNA erfolgte mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die cDNA wurde anschließend in 120 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen. qRT-PCRs wurden für die Kokulturrexperimente mit einem Applied Biosystems 7300 Real-Time-PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) und für die Mammakarzinomzellen mit

5 Material und Methoden

einem StepOnePlus RealTime PCR-System (ThermoFisher Scientific, Waltham) durchgeführt. Die Proben wurden in Duplikaten aufgetragen und nach Herstellerangaben analysiert. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), 18S ribosomale RNA (18S) und TATA-bindendes Protein (TBP) wurden als potentielle endogene Kontrollgene untersucht. Nach Bestrahlung mit 10 Gy in OSC-1 und NHDF zeigte sich keine Regulierung der mRNA-Expression in den genannten Kontrollen (Abbildung 7). Als endogene Kontrolle für alle weiteren Versuche wurde daher GAPDH gewählt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die erhaltenen Schwellenwerte (C_t) wurden mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode für die Ermittlung der relativen mRNA-Expression verwendet (Livak & Schmittgen 2001). Für die Statistik wurden die Daten logarithmiert um eine Normalverteilung annehmen zu können.

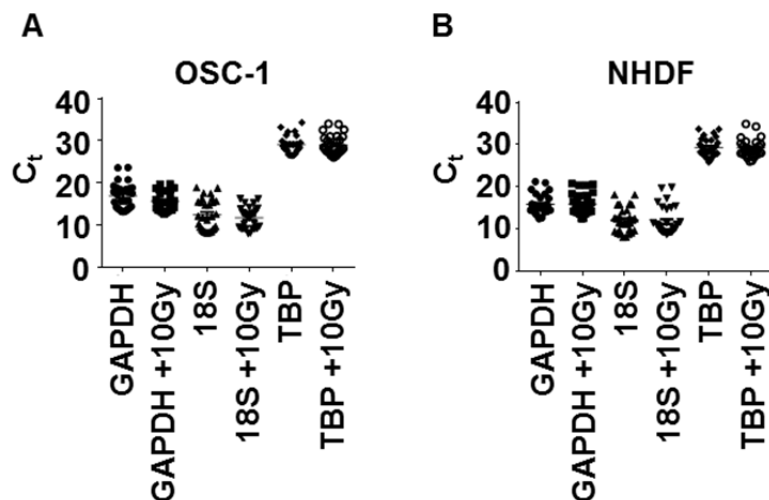


Abbildung 7: Endogene Kontrollen für qRT-PCR. In OSC-1 (A) und NHDF (B) wurden die C_t -Werte der endogenen Kontrollgene GAPDH, 18S und TBP nach Bestrahlung mit 10 Gy untersucht.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Primer für die qRT-PCR.

	<i>Forward (5'→3')</i>	<i>Reverse (5'→3')</i>
GAPDH	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	TGAGGTCAATGAAGGGGTC
RHAMMpan	GAATTTGAGAATTCTAAGCTTG	CCATCATACCCCTCATCTTTGTT
RHAMMv1	CTTCGGAATCAAAGAAGGAATCTCA	TCCAACCTCAGTTTCCAGATCCT
RHAMMv2	TCGGAATCAAAGGAATCTCAAAGA	TCCAACCTCAGTTTCCAGATCCT
RHAMMv3	TCGGAATCAAAGATTCGTGTTCTT	TCCAACCTCAGTTTCCAGATCCT
RHAMMv4	GACCCTTCTGATTTCGTGTTCTTC	TCCAACCTCAGTTTCCAGATCCT
HAS1	TACAACCAGAAGTTCCTGGG	CTGGAGGTGTACTTGGTAGC
HAS2	GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA	TCCAACCATGGGATCTTCTT
HAS3v1	CCTTCCCCTACCCAGAGC	GAAGTGGTAGCCCGTCACAT
HAS3v2	TGAGCTCCGGAGCGCGGC	GAAGTGGTAGCCCGTCACAT
HAS3v3	TTCTCTTCAGCGCCTCTTTC	GAAGTGGTAGCCCGTCACAT
HAS3v4	CCGCACCTTCTACGACCTC	GAAGTGGTAGCCCGTCACAT
HAS3v5	GCGGCTCCTGTTTTGTGAAT	CTCCTCCTCTTG TGCCCG
18S	GCAATTATTCCTCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA

Da sich die *RHAMM*-Varianten v1 und v2 in nur drei Basen unterscheiden und die Schmelzkurven der PCR-Produkte zwei Maxima zeigten (Abbildung 8A, 8B), musste die Funktionalität beider Primer kontrolliert werden. Zur Überprüfung, ob die Schmelzkurvenmaxima auf eine nicht-spezifische Amplifikation hinweisen, wurden die resultierenden RT-PCR-Produkte weitergehend untersucht. Eine Eingabe der PCR-Produkte in das Schmelzkurvenprogramm uMelt der Universität von Utah (Dwight *et al.* 2011) berechnete zwei Schmelzkurvenmaxima für die hervorgesagten RT-PCR-Produkte (Abbildung 8C, D). Die Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte, dass die RT-PCR-Produkte trotz des Unterschiedes in nur drei Basen *RHAMMv1*- und *RHAMMv2*-spezifisch binden und somit eine eindeutige Unterscheidung der Spleißvarianten erlauben (Abbildung 8E-F).

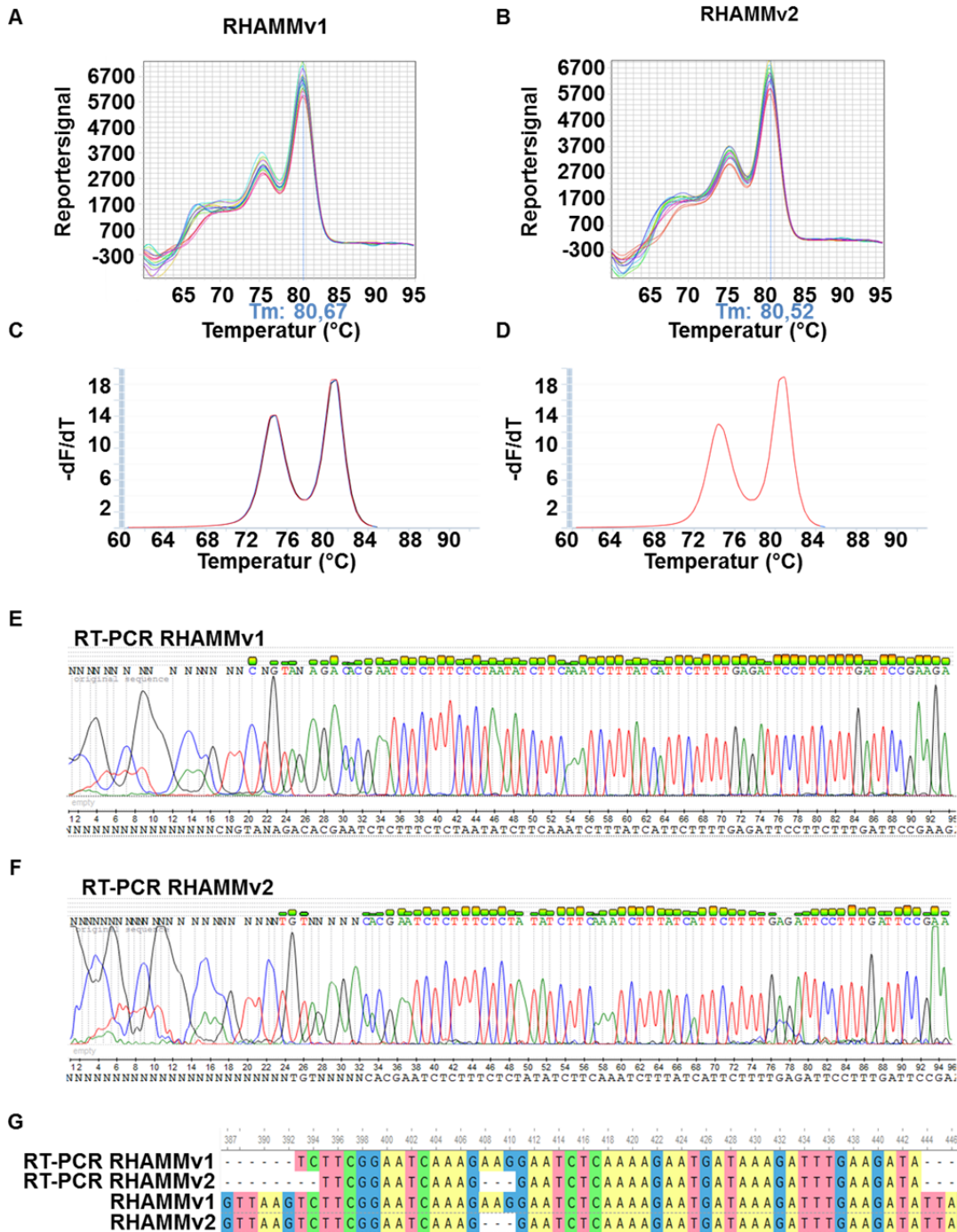


Abbildung 8: Untersuchung der RHAMMv1- und RHAMMv2-spezifischen Primer durch Schmelzkurvenanalyse und Sequenzierung der resultierenden PCR-Produkte. Die Schmelzkurven der qRT-PCR-Analyse von den RT-PCR-Produkten sind mit den Primern für A, RHAMMv1 und B, RHAMMv2 mit StepOnePlus RealTime PCR System Software dargestellt. Da zwei Maxima der Schmelzkurve üblicherweise auf eine nicht-spezifische Amplifikation hinweisen, wurden die theoretisch erhaltenen RT-PCR-Produkte über die Eingabemaske uMelt (Universität Utah) analysiert. Die erhaltenen theoretischen Schmelzkurven für C, RHAMMv1-Primer und D, RHAMMv2-Primer sind gezeigt. Zur Überprüfung der tatsächlichen Sequenz wurden die resultierten PCR-Produkte im BMFZ (Universität Düsseldorf) zur Sequenzierung gegeben. Die erhaltenen Sequenzen für das PCR-Produkt von E, RHAMMv1 und F, RHAMMv2 wurden mit dem Programm UGENE (Unipro) dargestellt. G, Zeigt das erhaltene Alignment der RT-PCR-Produkte von RHAMMv1- und RHAMMv2-Primern mit den theoretischen Sequenzen von RHAMMv1 und RHAMMv2. Das Alignment wurde mit dem Programm UGENE (Unipro) erstellt.

Nach erfolgreicher Überprüfung der Primerspezifität wurden die Transfektionseffizienzen in MCF-7 und MDA-MB-231-Zellen 48 h nach Transfektion getestet. Die Zellen wurden in Duplikaten ausgesät und für die Bestimmung der mRNA-Expression gepoolt. Die designten siRNAs siRHAMMv1, siRHAMMv2, siRHAMMv3 sowie von siRHAMM1/2.2 erwiesen sich als ineffizient (Anhang Abbildung 41A-B, 41D, 42A). Die siRNAs siRHAMMv3.2, siRHAMMv4, siRHAMMv1/2 und siRHAMMv1/2/3 erwiesen sich als effektiv (Anhang Abbildung 41C, 41E, 42A, 42B).

5.8. Immunofluoreszenzfärbung und Affinitätszytochemie von HA

5.8.1. Immunofluoreszenzfärbung

Für die Immunofluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf einem Deckgläschen ausgesät. Zum Analysezeitpunkt wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einer 10-minütigen Permeabilisierung mit 0,3 % Triton X-100 in 5 % BSA in PBS wurde für weitere 50 min in 5 % BSA in PBS-Lösung blockiert. Die anschließende Inkubation mit Erstantikörper (Tabelle 7) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 2,5 % BSA in PBS. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurde das Präparat für 45 min bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper inkubiert (Tabelle 7). Im Anschluss erfolgte die Asservation des Präparats durch Eindecken mit *ProLong Gold Antifade Mountant* (Life Technologies, Carlsbad) auf einem Objektträger. Die Fluoreszenzaufnahmen entstanden am Axio Observer.Z1 und mit dem Modul ApoTome.2 (beides Carl Zeiss, Oberkochen).

5.8.2. Affinitätszytochemie von HA

Da HA als Glykosaminglykan nicht von Antikörpern gebunden werden kann, erfolgt die Detektion durch biotinyliertes Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP). Die Fixierung der HA erfolgte mit essigsauerm Puffer bestehend aus 70 % Ethanol (VWR, Langenfeld), 4 % PFA und 0,5 % Eisessig in PBS für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit 5 % BSA in PBS blockiert. HABP (Calbiochem, Billerica) wurde in einer 1:250-Verdünnung in 2,5 % BSA in PBS auf

die Zellen pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Streptavidin-FITC (Dako, Glostrup) in PBS für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem 3-maligen Waschen erfolgte die Asservation des Präparats durch Eindeckung mit *ProLong Gold Antifade Mountant* (Life technologies, Carlsbad) auf einem Objektträger. Die Fluoreszenzbilder wurden am Axio Observer.Z1 und mit dem Modul ApoTome.2 (beides Carl Zeiss, Oberkochen) aufgenommen.

5.8.3. Hoechst-PI-Lebendzellfärbung

Zur Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde die Hoechst-PI-Lebendzellfärbung angewendet. Hoechst33342 ist in der Lage, die Zellmembran zu permeieren. Apoptotische und sich teilende Zellen weisen eine deutlich stärkere Färbung auf und können daher von normalen Zellen unterschieden werden. PI hingegen permeiert nur nekrotische Zellen, wodurch diese Zellen zusätzlich durch Anregung im roten Wellenlängenbereich (535–615 nm; Cy3; PE) Licht emittieren. Für die Lebendzellfärbung wurden 3 mM Hoechst33342 und 5 mg/mL PI in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 1:1.000 dem Medium zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Zellen mit konstanter Belichtungszeit mikroskopiert. Die Anzahl der apoptotischen sowie nekrotischen Signale wurden auf die Gesamtzellzahl normalisiert. Zur Differenzierung zwischen Fibroblasten und Tumorzellen wurden die Tumorzellen mit dem spezifischen Epithelienmarker (Anti-EpCam-Alexa488, Biolegend, San Diego) angefärbt.

5.8.4. Untersuchung des zellulären Transfers von Mitochondrien durch *Tunneling Nanotubes*

Zur Untersuchung, ob Mitochondrien von Fibroblasten zu Tumorzellen geschleust werden, wurden Fibroblasten mit dem Mitochondrienmarker Mitotracker oder dem auf Bacculoviren basierenden System CellLight Mitochondria-GFP (Life Technologies, Carlsbad) gefärbt. Der anschließende Versuchsaufbau entsprach Abbildung 3 (siehe 5.1.1). Für die Unterscheidung zwischen Fibroblasten und Tumorzellen wurde der Epithelienmarker EpCam (Biolegend, San Diego) genutzt. Um auszuschließen, dass verbleibender Farbstoff im Überstand der Fibroblasten zur Anfärbung der

5 Material und Methoden

Mitochondrien der Tumorzellen führte, wurde der Überstand von gefärbten Fibroblasten für 48 h auf ungefärbte Tumorzellen gegeben. Eine Anfärbung der Tumorzellmitochondrien konnte nicht detektiert werden. Die mikroskopische Auswertung erfolgte am Axio Observer.Z1 und dem Modul ApoTome.2 (beides Carl Zeiss, Oberkochen).

Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper und Farbstoffe für Immunzytochemie.

Antikörper und Farbstoffe	Verd./ Endkonz.	Isotyp	Best.-Nr.	Hersteller
RHAMM, CD168 [EPR4055]	1:1.000	Kaninchen	GTX62573	GeneTex, Irvine
p53 [DO-1]	1:1.000	Maus	OP-43	Calbiochem, Billerica
HABP	1:500	-	385911	Calbiochem, Billerica
Streptavidin-FITC	1:1.000	-	F0422	Dako, Glostrup
AF488 goat anti-Rabbit IgG	1:1.000	Ziege	A11034	Life Technologies, Carlsbad
AF568 F(ab') ₂ fragment of goat anti-Mouse IgG (H+L)	1:1.000	Ziege	A11019	Life Technologies, Carlsbad
CD326 (EpCAM)-PE [HEA-125]	1:500	Maus	130-061-101	Miltenyi Biotechnology, Bergisch Gladbach
Alexa Fluor [®] 488 anti-human CD326 (EpCAM) Antibody	1:1.000	Maus	324209	Biolegend, San Diego
Mitotracker [®] Red CMXRos	40 nM	-	M-7512	Invitrogen, Carlsbad
Hoechst 33342	3 µM	-	H3570	Invitrogen, Carlsbad
Propidiumiodid	5 µg/mL	-	P4170	Sigma-Aldrich, St. Louis

5.9. Signaltransduktionsanalyse

Zur Untersuchung apoptotischer Signalwege wurden die Zellen in Path Scan[®] Sandwich ELISA Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Danvers) lysiert und mit dem Path Scan[®] Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit (Cell Signaling Technology, Danvers) analysiert. Hierbei wurden simultan 18 Signalproteine auf ihren Phosphorylierungsstatus untersucht. Die Lysate wurden auf 600 µg/mL verdünnt und 75 µL der Lysate auf die mit Antikörper vorbeschichtete Nitrozellulosemembran aufgebracht. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit

dem Primärantikörper inkubiert, und anschließend mit den Detektionsantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurde mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertem Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion wurde das Substrat auf die Nitrozellulosemembran gegeben und das infrarote Chemilumineszenzsignal mittels Odyssey Infrared Imaging System (*application software* 3.0) von Li-Cor (Bad Homburg) detektiert und ausgewertet.

5.10. Bestimmung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies

5.10.1. DCF-Methode

Zur Untersuchung des zellulären Gehalts reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wurde die 2',7'-Dichlorofluorescein-(DCF)-Messung angewandt. Hierbei wird das Diacetat 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat ($\text{H}_2\text{DCFDA-AM}$) von der Zelle aufgenommen und durch zelleigene Esterasen gespalten, wodurch das nicht-fluoreszierende H_2DCFDA -Molekül in der Zelle gefangen ist. Durch Hydroxyl- oder Peroxyl-Radikale sowie andere ROS wird das nicht-fluoreszierende Molekül zu DCF oxidiert, welches bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm bei einem Maximum von 525 nm fluoresziert. Die intrazelluläre ROS-Messung wurde 24 h nach Ansetzen der Kokultur durchgeführt. Das Medium wurde hierfür abgenommen, die Zellen mit HBSS gewaschen und mit 100 μM $\text{H}_2\text{DCFDA-AM}$ (Life Technologies, Carlsbad) 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem temperierbaren Mikroplattenmessgerät (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emission von 520 nm mit der Software OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg) analysiert. Die Datenanalyse erfolgte mit den Endpunktwerten der Datenmessung. Als Positivkontrolle wurden Zellen für 1 h vor der DCF-Messung mit 250 μM H_2O_2 stimuliert.

5.10.2. DHE-Messung

Da die DCF-Messungen auch durch andere ROS beeinflusst werden kann (Rothe & Valet 1990; Hoffman, *et al.* 2008), sollte zur Verifizierung der DCF-Ergebnisse noch eine weitere Methode zur ROS-Bestimmung durchgeführt werden. Mit Hilfe der Dihydroethidium (DHE)-Methode können die Zellen auf Superoxide, eine andere Art

5 Material und Methoden

der ROS, untersucht werden. DHE ist in der Lage, die Zellmembran zu permeieren und intrazelluläre Superoxide zu detektieren (Peshavariya *et al.* 2007). Für die Untersuchungen wurden die Zellen zum Analysezeitpunkt mit StemPro® Accutase® (ThermoScientific, Waltham) vom Plastik abgelöst und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Probe geteilt und jeweils 300 µL PBS mit 5 µM DHE (Sigma, St. Louis) oder ohne DHE aufgenommen. Die Proben wurden für 30 min bei Standardkultivierungsbedingungen inkubiert und im gelben (Yel) Kanal (583/26 nm) mit dem Guava easyCyte 5 Durchflusszytometer vermessen und ausgewertet. Das Reaktionsprodukt von DHE mit Superoxiden emittiert ein Emissionsmaximum bei 580 nm. Der Median der Fluoreszenzintensität wurde für die Quantifizierung der Lebendzellpopulation von 10.000 Zellen verwendet.

5.11. Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Experimenten mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla) analysiert und dargestellt. Datensätze wurden mittels ungepaartem Student's-t-Test verglichen, wenn nur zwei Gruppen von Daten getestet wurden. Um signifikante Unterschiede zwischen drei und mehr Konditionen zu überprüfen, wurden die Daten mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und nachfolgendem *post hoc* Test nach *Sidak's multiple comparison* durchgeführt. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

6. Ergebnisse

6.1. Strahlenantwort in Mammakarzinom-Zelllinien

6.1.1. Zelluläre Antwort von Mammakarzinomzellen auf ionisierende Bestrahlung

Zunächst wurde die Strahlensensitivität von zwei unterschiedlichen Mammakarzinom-Zelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231) bei einer Strahlendosis von 2 Gy untersucht. 48 h nach Bestrahlung zeigten die wenig invasiven MCF-7-Zellen eine signifikant verringerte Lebendzellzahl und eine erhöhte Apoptoserate (Abbildung 9A-D). Die Proliferationsrate der Zellen war unbeeinflusst (Abbildung 9A-D). Die invasive Zelllinie MDA-MB-231 hingegen zeigte weder Unterschiede in der Proliferations- noch in der Apoptoserate (Abbildung 9A-D).

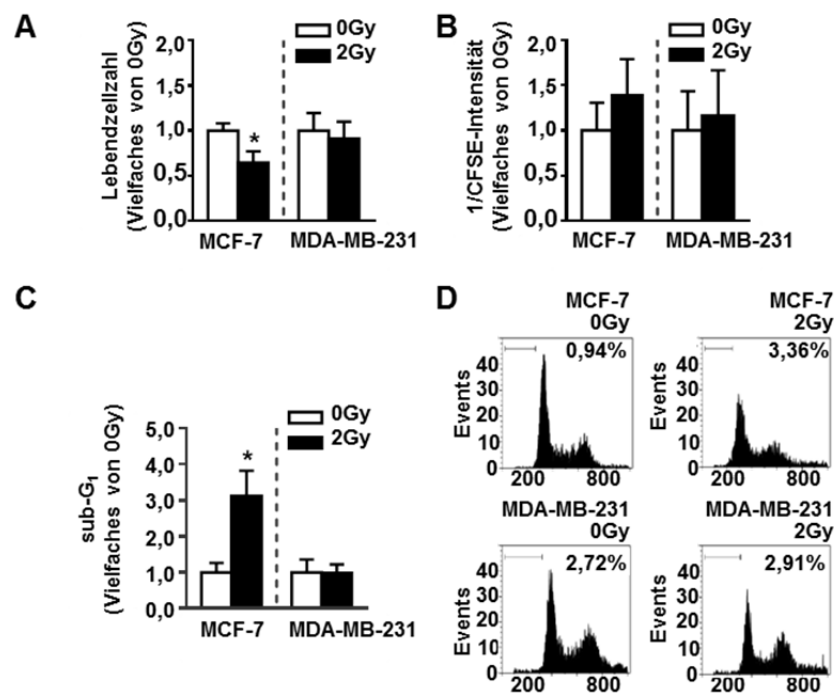


Abbildung 9: Strahlenantwort von Mammakarzinomzellen. Zur Untersuchung der Strahlenantwort wurden die Mammakarzinomzellen 48 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy geerntet und den folgenden Analysen unterzogen. A, Lebendzellzahlbestimmung durch Trypanblau-Ausschluss mit Hilfe des Countess-Zählgerätes. n = 5. B, Durchflusszytometrische Bestimmung der Proliferationsrate von Mammakarzinomzellen, die bei der Aussaat mit CFSE gefärbt wurden. n = 3. C, Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellen, die sich in der sub-G₁-Phase des Zellzyklus befinden. n = 8. D, Zeigt repräsentative Histogramme von MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen in der sub-G₁-Analyse. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu unbestrahlten MCF-7-Zellen.

6.1.2. Signalwegaktivierung durch ionisierende Strahlung

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Signaltransduktionswege der erhöhten Apoptoserate in MCF-7-Zellen durch Bestrahlung zugrunde liegen. Hierzu wurden MCF-7-Zellen mit 2 Gy bestrahlt und 19 Signalproteine simultan analysiert, für die eine Beteiligung an apoptotischen Prozessen beschrieben wurde. Eine signifikante Erhöhung von p53 und der Phosphorylierung von p38 konnte detektiert werden (Abbildung 10). Diese Beobachtung wurde anschließend in Western-Blot-Analysen für p53 (Abbildung 11A) sowie p38 und pp38 (Abbildung 11B) verifiziert.

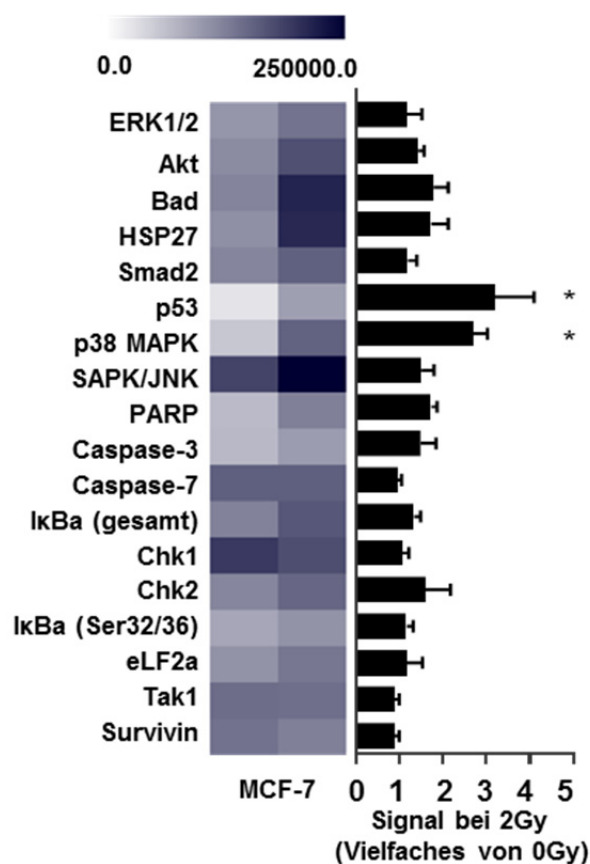


Abbildung 10: Signalwegsaktivierung von radiosensitiven MCF-7-Zellen. Ergebnisse des PathScan® Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kits zur Untersuchung beteiligter Signalwege bei der strahlungsinduzierten Apoptose von MCF-7-Zellen. Hierfür wurden die MCF-7-Zellen einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy ausgesetzt und nach 48h analysiert. Dargestellt sind die *Heatmap* und die Quantifizierung der Daten, welche durch Normierung der Signale auf unbestrahlte MCF-7-Zellen erfolgte, durchgeführt in vier technischen Replikaten. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. *, $p < 0,05$ im Vergleich zu unbestrahlten MCF-7-Zellen.

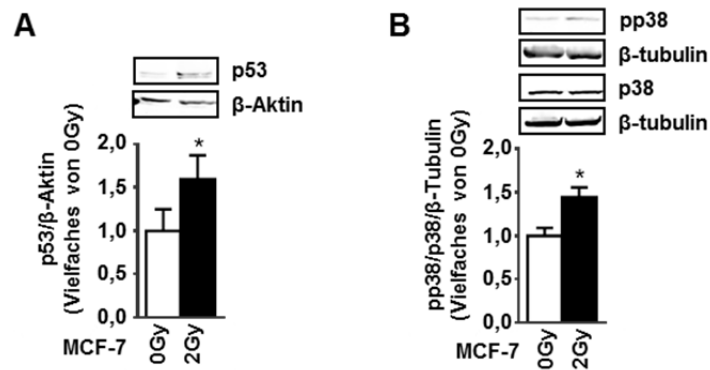


Abbildung 11: Proteinexpressionsanalyse von p53 und p38 in MCF-7-Zellen. Zur Verifizierung der PathScan®-Ergebnisse wurden Western-Blot-Analysen von p53 und p38 durchgeführt. Die Proteinexpression von p53 (A) und p38 sowie deren phosphorylierte Variante pp38 (B) von MCF-7-Zellen sind 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy gezeigt. Mittelwerte \pm SEM von $n=5, 4$. *, $p < 0,05$ im Vergleich zu unbestrahlten MCF-7-Zellen.

Es ist bekannt, dass p38-Aktivierung zu p53-vermitteltem Zelltod führen kann (Perfettini *et al.* 2005). Da gezeigt werden konnte, dass sowohl p38 als auch p53 nach Bestrahlung im aktivierten Zustand vorhanden sind, kann angenommen werden, dass die Aktivierung von p53 durch pp38 erfolgt. Im Folgenden sollte daher die Bedeutung von p53 als Effektorprotein für die strahlungsinduzierte Apoptose in MCF-7-Zellen detaillierter analysiert werden. Hierzu wurde die Expression von p53 mit Hilfe zweier siRNAs reduziert. In der Tat zeigten sip53-transfizierte MCF-7-Zellen keine Erhöhung der Apoptose nach Bestrahlung (Abbildung 12A). Ein Einfluss auf die Proliferationsrate konnte weder durch sip53 Behandlung noch durch ionisierende Strahlung detektiert werden (Abbildung 12B).

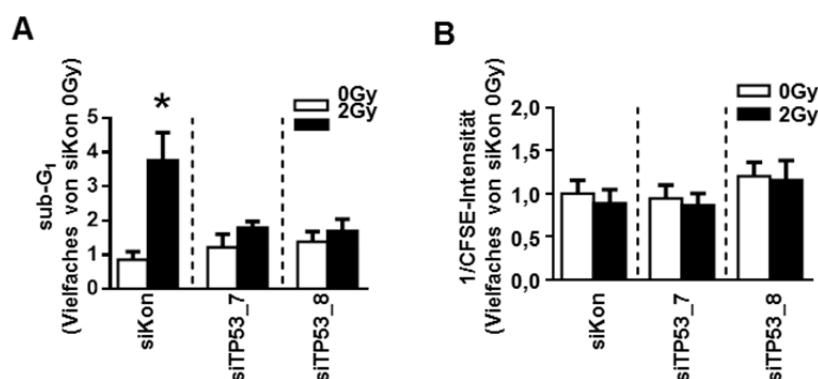


Abbildung 12: Rolle von p53 bei dem strahlungsabhängigen Zelltod. MCF-7-Zellen wurden mit siRNAs gegen p53 (TP53) und Kontroll siRNA (siKon) transfiziert, mit einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy behandelt und nach 48 h analysiert. $n = 4-6$. A, Durchflusszytometrische Analyse von MCF-7-Zellen, die sich in der sub-G₁-Phase befinden. $n = 4$. B, Durchflusszytometrische Messung der Proliferationsrate in CFSE-gefärbten MCF-7-Zellen. Mittelwert \pm SEM dargestellt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zu siKon-transfizierten MCF-7-Zellen.

6.1.3. p53-Status in MCF-7 und MDA-MB-231-Zellen

Von Interesse im Zusammenhang mit der p53-Regulation war es, Unterschiede zwischen strahlungssensitiven MCF-7- und strahlenresistenten MDA-MB-231-Zellen herauszuarbeiten. In der Literatur ist beschrieben, dass die Mammakarzinom-Zellen MCF-7 Wildtyp-p53 exprimieren (Lu *et al.* 2001) während MDA-MB-231-Zellen über eine mutierte Form des Proteins verfügen (Olivier *et al.* 2002). Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte in MCF-7-Zellen eine geringere p53-Färbung, die jedoch nach Bestrahlung mit 2 Gy in apoptotischen Körperchen ansteigt (Abbildung 13). Im Vergleich hierzu wiesen MDA-MB-231-Zellen – vermutlich durch das Vorhandensein von mutiertem p53 – eine Akkumulation von p53 im Zellkern auf, welche nicht auf Bestrahlung ansprach (Abbildung 13).

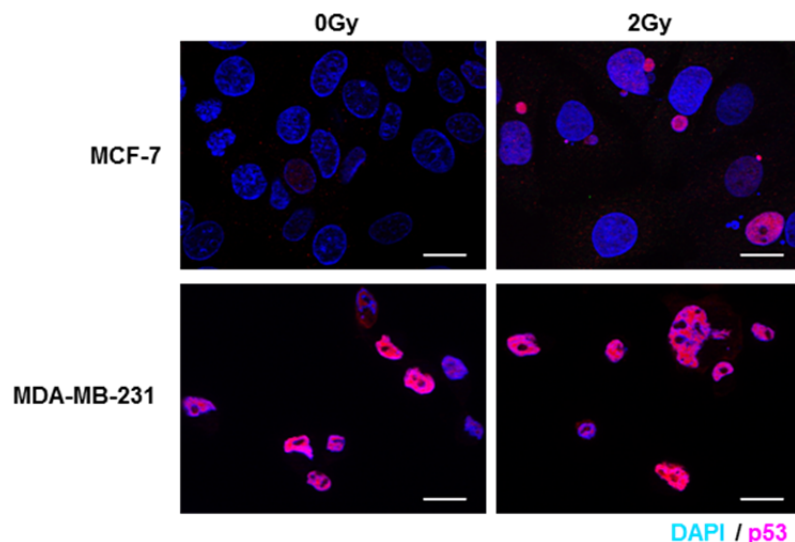


Abbildung 13: p53-Expression in Mammakarzinomzellen in der zellulären Strahlenantwort. Mammakarzinomzellen wurden 48 h nach der Bestrahlung von 2 Gy fixiert und immunozytochemisch für p53 gefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μm . Repräsentative Abbildungen von $n = 4$ unabhängigen Experimenten.

6.1.4. Regulation von RHAMM durch p53

In vorausgehenden Arbeiten konnte ein Zusammenhang der *RHAMM*-Expression mit der Tumorentität für unterschiedliche Tumorentitäten gezeigt werden (Crainie *et al.* 1999; Niedworok *et al.* 2013; Augustin *et al.* 2015; Tilghman *et al.* 2014; Zlobec *et al.* 2008; Ishigami *et al.* 2011; Hatano *et al.* 2013; Tzankov *et al.* 2011; Gust *et al.* 2009; Wang *et al.* 1998). Zusätzlich konnten Sohr *et al.* (2008) nachweisen, dass p53 einen wichtigen Repressor der *RHAMM*-Expression darstellt. Um diesen Sachverhalt in den untersuchten Zelllinien zu analysieren, wurden Zellen mit siRNA gegen p53

behandelt. Tatsächlich konnte festgestellt werden, dass die Reduktion von p53 in beiden Zelllinien mit einer Zunahme von RHAMM einherging (Abbildung 14).

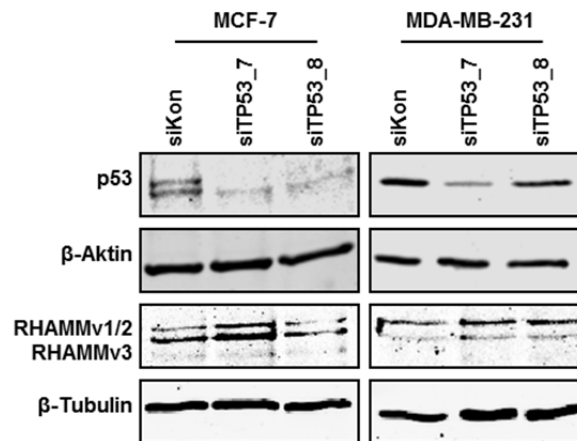


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen p53 und RHAMM. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen p53 und RHAMM wurde in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen eine Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. siRNA (siTP53_7 und siTP53_8) gegen p53 durchgeführt. Die transfizierten MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion analysiert. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots für p53 mit β-Aktin als endogene Kontrolle sowie RHAMM mit β-Tubulin als endogene Kontrolle.

6.1.5. Einfluss von RHAMM auf den zellulären Phänotyp von Mammakarzinom-Zelllinien

Durch die Aktivierung von RHAMM vermittelt dieser HA-Rezeptor Beweglichkeit (Hamilton *et al.* 2007) sowie Invasion und Metastasierung (Hall *et al.* 1995). Zudem konnte die *RHAMM*-Expression bei Brustkrebspatienten mit einem verschlechterten rezidivfreien und Gesamt-Überleben korreliert werden (Assmann *et al.* 2001; Bièche *et al.* 2004). Der Einfluss von *RHAMM* auf den zellulären Phänotyp von Mammakarzinomzellen ist bislang weitgehend unbekannt und wurde daher in den folgenden Analysen untersucht. Zu diesem Zweck wurde RHAMM in wenig invasiven MCF-7- sowie in invasiven MDA-MB-231-Zellen mittels siRNA herabreguliert. In beiden Zelllinien konnte eine Abnahme der mRNA von $62,6 \pm 13,9 \%$ (MCF-7) und $80,4 \pm 6,3 \%$ (MDA-MB-231) erreicht werden (Abbildung 15A). Die Reduktion der *RHAMM*-Expression führte in keiner der beiden Zelllinien zu einer Veränderung der Proliferationsrate, welche durch Messung der CFSE-Intensität analysiert wurde (Abbildung 15B). Des Weiteren wurde der Einfluss von RHAMM auf die Apoptoserate, anhand der sich in der sub-G1-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen, evaluiert. Hierbei wurde eine signifikant erhöhte Apoptoserate in den

siRHAMM behandelten MCF-7-Zellen beobachtet. siRHAMM transfizierte MDA-MB-231-Zellen zeigten keine veränderte Apoptoserate (Abbildung 15C).

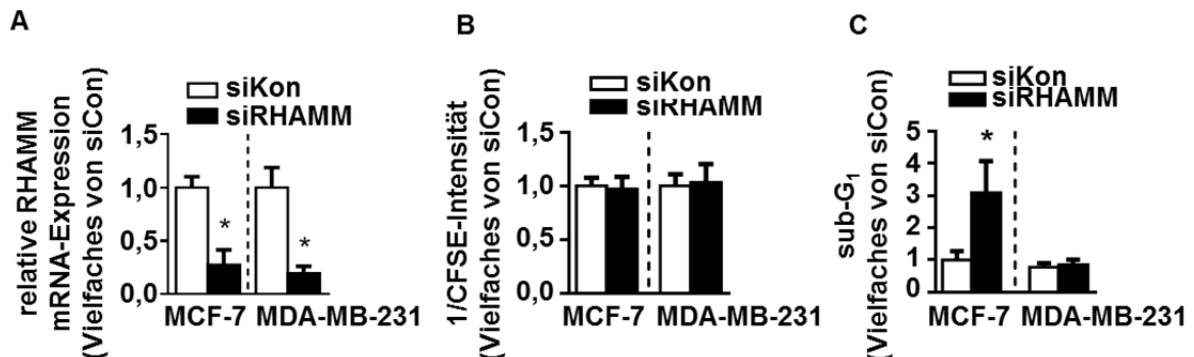


Abbildung 15: Differentielle Regulation des zellulären Phänotyps durch *RHAMM* in Mammakarzinomzellen. A, *Knock-down*-Effizienz auf mRNA-Ebene 48 h nach reverser Transfektion. n = 4 B, Durchflusszytometrische Messung der Proliferationsrate von CFSE-gefärbten Mammakarzinomzellen. n = 5. C, Durchflusszytometrische sub-G₁-Messung. n = 5. Mittelwerte ± SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu MCF-7-Zellen mit siKon-Transfektion.

Zur Untersuchung der *RHAMM*-Funktionalität in Bezug auf den metastatischen Phänotyp der Zellen *in vitro* wurden Migrationsversuche sowie Versuche zur Fähigkeit der Zellen zum adhäsionsfreien Wachstum (Softagar-Versuche) durchgeführt. Die wenig mobilen MCF-7-Zellen zeigten keine weitere Reduktion der Mobilität durch den Verlust von *RHAMM*. Im Gegensatz hierzu wurde in MDA-MB-231-Zellen eine Reduktion der Mobilität detektiert, welche sich in einer signifikanten Abnahme der akkumulierten Distanz und der Bewegungsgeschwindigkeit äußerte (Abbildung 16A-C). Bezüglich ihrer Fähigkeit zum adhäsions-unabhängigen Wachstum zeigte sich, dass eine *RHAMM*-Herabregulation in MCF-7-Zellen zu keiner Reduktion der geformten Kolonien führte (Abbildung 16D-E). MDA-MB-231-Zellen hingegen wiesen eine verringerte Anzahl an Kolonien 14 Tage nach der Transfektion auf (Abbildung 16D-E). Zusammenfassend geben die erlangten Daten Hinweise darauf, dass *RHAMM* den Phänotyp in den unterschiedlichen Zellen differentiell reguliert. Während es in den MDA-MB-231-Zellen eine wichtige Rolle für Mechanismen der Metastasierung (Invasion, adhäsionsfreies Wachstum) zu spielen scheint, übernimmt es in MCF-7-Zellen Funktionen, welche das Überleben der Zelle regulieren.

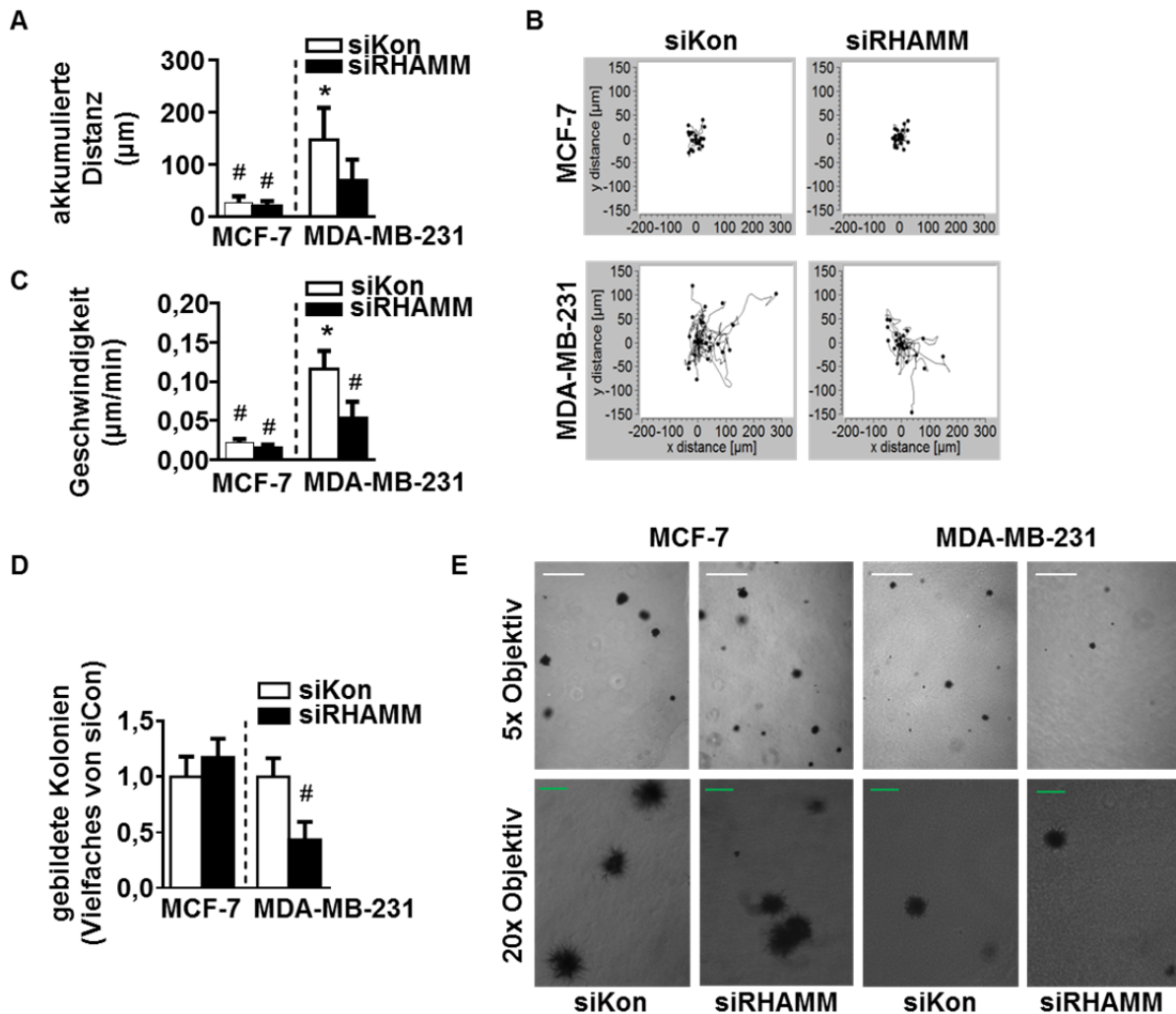


Abbildung 16: RHAMM-Knockdown verändert die Migration und das Überleben von MDA-MB-231-Zellen. A, Akkumulierte Distanz mit B, exemplarischen Motilitätsverläufen und C, Geschwindigkeit von siRHAMM-transfizierten MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen 72 h nach reverser Transfektion. n = 4. D, Anzahl an gebildeten Kolonien 14 Tage nach Durchführung des Soft-Agar-Versuchs bei dem Mammakarzinomzellen 48 h nach Transfektion in Agarose ausgesät wurden. n = 4. E, Zeigt exemplarische Aufnahmen der gebildeten Kolonien (5x Objektiv: Maßstab Balken (weiß) 100 μm; 20x Objektiv: Maßstab Balken (grün) 100 μm). Mittelwerte ± SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu MCF-7-Zellen mit siKon-Transfektion; #, p < 0,05 im Vergleich zu MDA-MB-231-Zellen mit siKon-Transfektion.

6.1.6. Rolle des Hyaluronsäurerezeptors RHAMM in der Strahlenantwort von Mammakarzinom-Zelllinien

Zur Untersuchung, ob ionisierende Strahlung einen Einfluss auf Expression von RHAMM hat, wurden MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen mit 2 Gy bestrahlt und nach 48 h analysiert. Die relative mRNA-Expression von *RHAMM* nach Bestrahlung zeigte eine Herabregulation in MCF-7-Zellen (Abbildung 17A). Im Vergleich zu MCF-7-Zellen wiesen MDA-MB-231-Zellen eine geringere basale mRNA-Expression auf, die durch Bestrahlung nicht verändert wurde (Abbildung 17A). Die immunzytochemische Färbung von RHAMM bestätigte die mRNA-Ergebnisse. Eine Abnahme von RHAMM

6 Ergebnisse

in bestrahlten MCF-7-Zellen sowie eine geringe basale RHAMM-Expression in MDA-MB-231-Zellen wurde detektiert (Abbildung 17B). Es ist beschrieben, dass unterschiedliches Spleißen von RHAMM den zellulären Phänotyp von Tumorzellen in Richtung eines aggressiveren Phänotyps beeinflusst (Maxwell *et al.* 2004; Du *et al.* 2011). Zur genaueren Untersuchung welche RHAMM-Spleißvarianten durch Bestrahlung reguliert werden, erfolgte eine Quantifizierung mittels Western-Blot-Analysen der RHAMM-Varianten v1/v2, v3 und v4. Da RHAMMv2 sich nur in der Deletion einer Aminosäure von RHAMMv1 unterscheidet, können diese beiden Varianten mit der gewählten Methode nicht unterschieden werden. Es zeigte sich, dass MDA-MB-231-Zellen eine geringere RHAMM-Proteinabundanz haben, als MCF-7-Zellen, die sich analog zu den mRNA-Ergebnissen nicht durch Bestrahlung verändern (Abbildung 17C). Bestrahlte MCF-7-Zellen wiesen eine geringere RHAMMv1/2-Expression auf, während sich die anderen RHAMM-Spleißvarianten, RHAMMv3 und RHAMMv4, nicht signifikant von den unbestrahlten Kontrollen unterscheiden (Abbildung 17C). Schlussfolgernd scheint lediglich RHAMMv1/2 durch Bestrahlung reguliert zu werden.

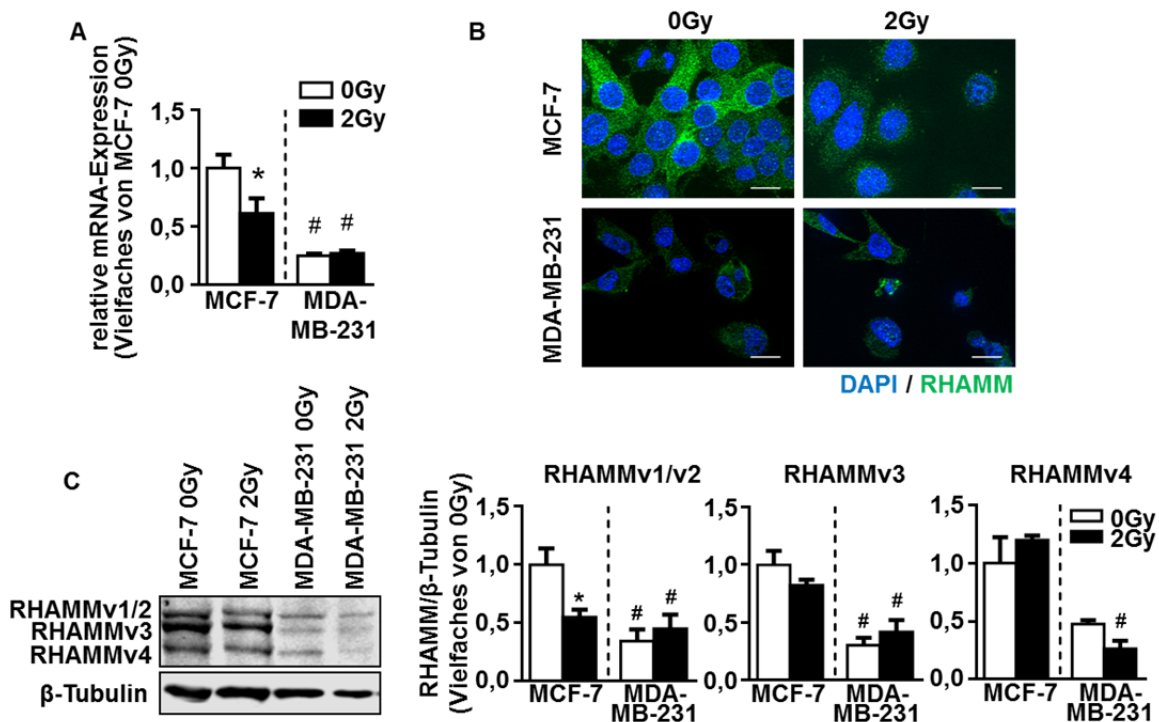


Abbildung 17: RHAMM-Expression in MCF-7- und MDA-MB-231 nach Bestrahlung mit 2 Gy. A, Die Expression von RHAMM auf RNA-Ebene wurde 24 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy bestimmt. n = 4. B, Immunocytochemische Färbung des Zellkerns (blau) und RHAMM (grün). MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurden 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy fixiert und permeabilisiert. Die Größe des Maßstabsbalkens entspricht 20 μ m. C, Für die Analyse der RHAMM-Proteinexpression wurden die Mammakarzinomzellen 48 h nach der Bestrahlung untersucht. n = 6. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *, p < 0,05 bestrahlte MCF-7- im Vergleich zu unbestrahlten MCF-7-Zellen. #, p < 0,05 MDA-MB-231 im Vergleich zu unbestrahlten MCF-7-Zellen.

6.1.7. Rolle der Spleißvarianten des Hyaluronsäurerezeptors *RHAMM* in der Strahlenantwort von Mammakarzinom-Zelllinien

Zur detaillierten Analyse der Rolle einzelner *RHAMM*-Spleißvarianten in der Strahlenantwort wurden variantenspezifische siRNAs designt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen bestrahlt oder scheinbestrahlt und weitere 48 h später analysiert (Abbildung 18). Erneut konnte eine signifikant vermehrte Apoptoserate in siRHAMMpan-behandelten MCF-7-Zellen im Vergleich zu siKontrolle-(siKon)-behandelten Zellen detektiert werden (Abbildung 18A). Dieser Effekt konnte durch Behandlung mit siRNA gegen *RHAMMv1/2* reproduziert und bei Reduktion von *RHAMMv1/2* und *RHAMMv3* sowie *RHAMMv4* noch verstärkt werden. Zusätzliche Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy veränderte die Apoptoserate nicht im Vergleich zu unbestrahlten siRHAMMpan, *RHAMMv3*, *RHAMMv1/2/3* und *RHAMMv4*. Im Gegensatz hierzu zeigten bestrahlte siRHAMMv1/2-Zellen eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu unbestrahlten siRHAMMv1/2 und siKon-behandelten Kontrollzellen. *RHAMMv1/2* scheint daher einen entscheidenden Einfluss auf apoptotische Prozesse in MCF-7-Zellen im nativen sowie bestrahlten Zustand zu haben.

Im Vergleich zu MCF-7-Zellen zeigte die Transfektion von MDA-MB-231-Zellen mit siRHAMMpan und siRHAMMv1/2, bezogen auf die jeweiligen Kontrollen, keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen (Abbildung 18B). Transfektion mit *RHAMMv3.2*, *RHAMMv1/2/3* sowie *RHAMMv4* erhöhte die Apoptoserate, verglichen mit den siKon-transfizierten Kontrollen signifikant. Zusätzliche Bestrahlung der Zellen führte in keiner der transfizierten Zellen zu einer additiv verstärkten Apoptose.

Die Proliferationsrate in MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollen (Abbildung 19).

Schlussfolgernd scheinen in MCF-7-Zellen alle Spleißvarianten einen Einfluss auf das Überleben der Zellen auszuüben, während in MDA-MB-231-Zellen nur *RHAMMv3* und *v4* an apoptotischen Prozessen beteiligt sind. Die Regulation von *RHAMM* durch ionisierende Strahlung beschränkt sich in MCF-7-Zellen ausschließlich auf die Spleißvarianten *RHAMMv1/2*. Die Beobachtung, dass MDA-MB-231-Zellen keine Strahlenempfindlichkeit zeigten, könnte demnach darin begründet sein, dass diese Zellen keine Regulation von *RHAMMv1/2* aufweisen. Im Vergleich zu MCF-7-Zellen haben MDA-MB-231-Zellen weniger basales

RHAMMv1/2. Es wäre daher möglich, dass die basale Expression von *RHAMMv1/2* einen entscheidenden Beitrag zur Strahlenempfindlichkeit leistet. Zellen mit einer hohen endogenen *RHAMMv1/2*-Expression scheinen hier stärker von Strahleneinflüssen beeinträchtigt zu werden als Zellen mit einer niedrigen endogenen *RHAMMv1/2*-Expression, die strahlenunempfindlich erscheinen.

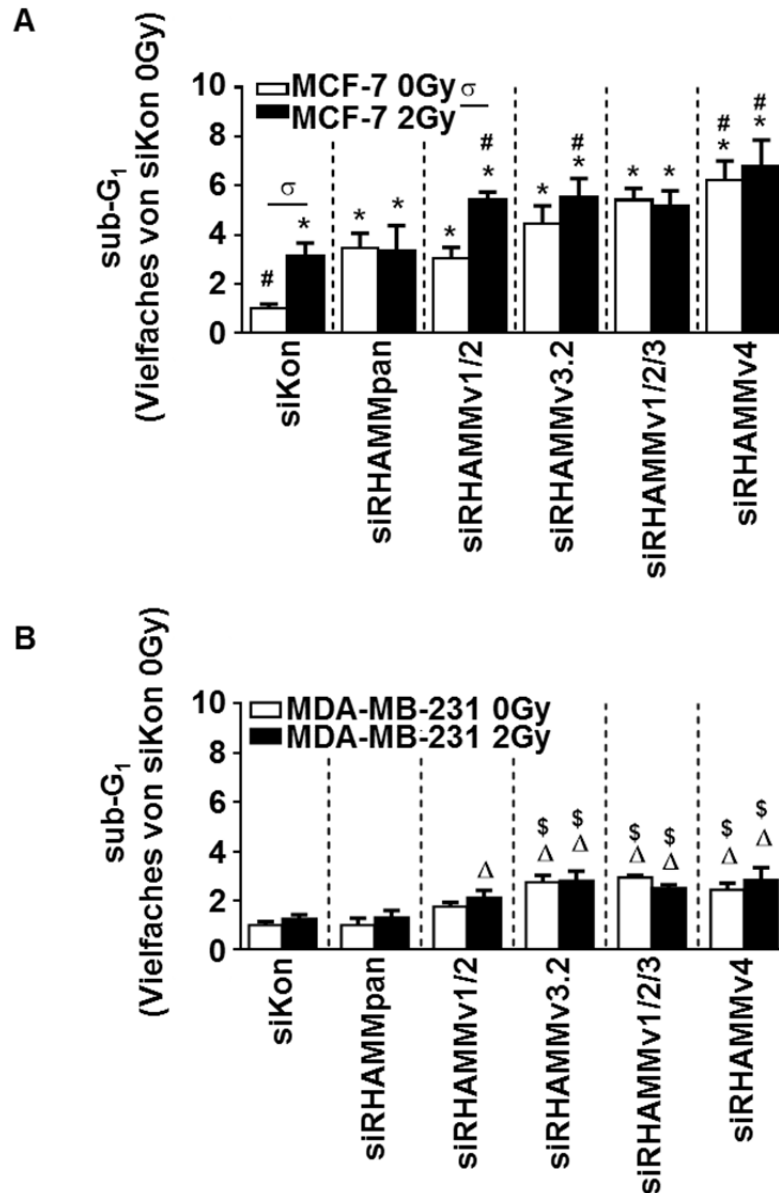


Abbildung 18: Regulation von *RHAMM*-Spleißvarianten in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen mit Bestrahlung in Hinblick auf Apoptose. Zur Untersuchung der Regulation der *RHAMM*-Spleißvarianten in der Strahlenantwort wurden MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen transfiziert und 48 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy analysiert. A, Durchflusszytometrische sub-G₁-Messung von MCF-7- und B, MDA-MB-231-Zellen, die mit siRNA gegen *RHAMM* und seine Spleiß-Varianten transfiziert wurden. n = 4. Mittelwert ± SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu unbestrahlten siKon-behandelten MCF-7-Zellen. #, p < 0,05 im Vergleich zu bestrahlten siKon-behandelten MCF-7-Zellen. σ, p < 0,05 bestrahlte siRHAMM-behandelte MCF-7-Zellen im Vergleich zu unbestrahlten siRHAMM-behandelten MCF-7-Zellen. Mittelwert ± SEM dargestellt. Δ, p < 0,05 im Vergleich zu unbestrahlten siKon-behandelten MDA-MB-231-Zellen. \$, p < 0,05 im Vergleich zu bestrahlten siKon-behandelten MDA-MB-231-Zellen.

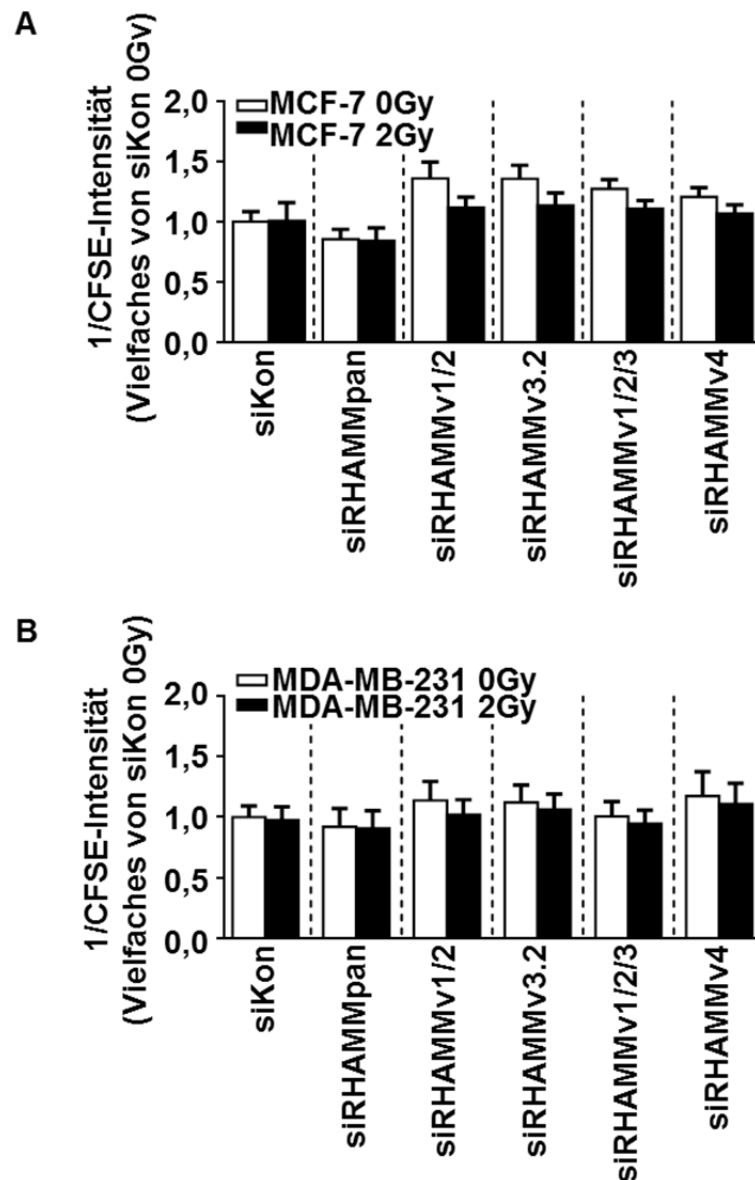


Abbildung 19: Regulation von *RHAMM*-Spleißvarianten in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen mit Bestrahlung in Hinblick auf Proliferation. Zur Untersuchung der *RHAMM*-Regulation in Kombination mit Bestrahlung auf die Proliferationsrate wurden die Mammakarzinom-Zellen mit CFSE gefärbt und transfiziert. 48 h nach Bestrahlung wurden die Proliferationsrate in A, MCF-7- und B, MDA-MB-231-Zellen analysiert. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM dargestellt.

6.1.8. Pharmakologische Beeinflussung zur Strahlensensitivierung in Mammakarzinom-Zelllinien

Unter Berücksichtigung der dargestellten Ergebnisse sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine pharmakologische Reduktion der Aktivierung des RHAMM-Rezeptors mit sich bringt. Hierzu wurde 4-MU als Synthesehemmer von HA genutzt, um durch Verminderung des Liganden die Rezeptoraktivität von RHAMM zu reduzieren.

Affinitätsfärbungen mit dem HA-Bindeprotein zeigten die erfolgreiche HA-Synthesehemmung sowohl in unbestrahlten als auch in bestrahlten Mammakarzinomzellen durch 4-MU (Abbildung 20).

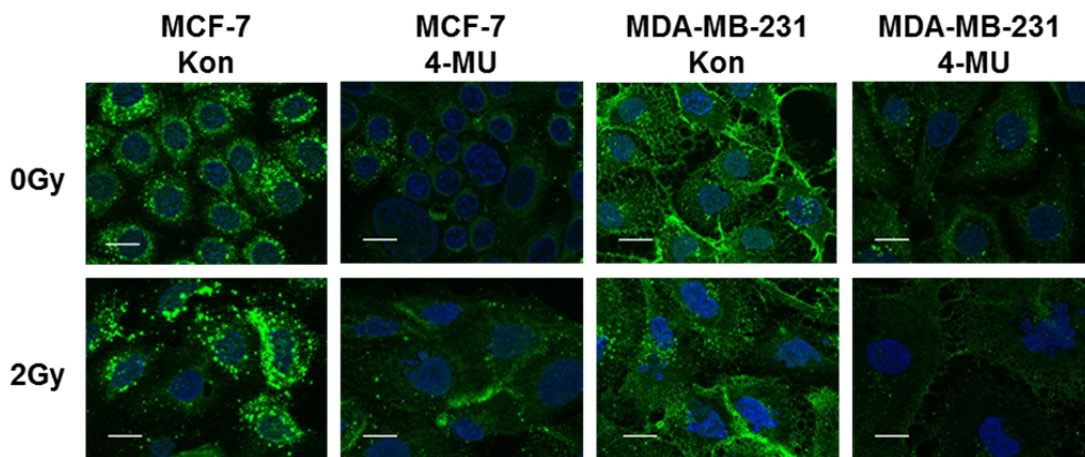


Abbildung 20: Pharmakologische Inhibition des RHAMM-Liganden HA. Zur Überprüfung der inhibierenden Wirkung von 4-MU auf die Bildung von HA wurden die Mammakarzinomzellen mit 300 μ M 4-MU behandelt und nach 24 h mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. 48 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen sauer fixiert und mit Hilfe des biotinylierten HA-Bindeproteins gefärbt und mikroskopiert. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. Repräsentative Abbildungen von n = 3 unabhängigen Experimenten.

Die alleinige Behandlung von beiden zu untersuchenden Zelllinien mit 4-MU zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate (Abbildung 21A). Ein additiver Effekt konnte detektiert werden bei simultaner Behandlung von MCF-7-Zellen mit 4-MU und ionisierender Bestrahlung. Interessanterweise sprachen MDA-MB-231-Zellen weder auf die Behandlung mit 4-MU noch auf Bestrahlung an, zeigten jedoch eine vermehrte Apoptoserate bei der Kombination beider Behandlungen (Abbildung 21A). 4-MU konnte somit in MDA-MB-231-Zellen Sensitivität gegenüber Bestrahlung hervorrufen. Die Proliferationsraten von MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen zeigten sich bei der Behandlung von 4-MU oder Bestrahlung und gleichzeitiger Behandlung unverändert (Abbildung 21B).

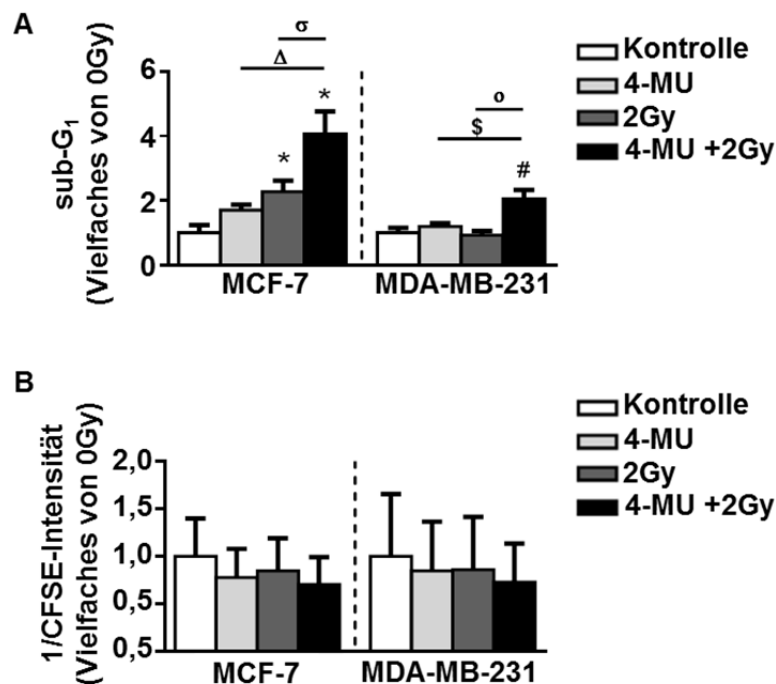


Abbildung 21: Pharmakologische Inhibition des RHAMM-Liganden HA führt sowohl in MCF-7- als auch in MDA-MB-231-Zellen nach Bestrahlung zu Apoptose. Die Mammakarzinomzellen wurden 24 h vor der Bestrahlung mit 300 µM 4-MU behandelt. 48 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy wurden die Zellen analysiert. A, Durchflusszytometrische Analyse der sub-G₁-Messung. B, Durchflusszytometrische Auswertung von CFSE-gefärbten Mammakarzinomzellen als Maß für die Proliferationsraten. n = 5. Mittelwert ± SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu unbestrahlten unbehandelten MCF-7-Zellen. Δ, p < 0,05 Bestrahlte und 4-MU-behandelte MCF-7-Zellen im Vergleich 4-MU-behandelten MCF-7-Zellen ohne Bestrahlung. σ, p < 0,05 bestrahlte 4-MU-behandelte MCF-7-Zellen im Vergleich zu bestrahlten unbehandelten MCF-7-Zellen. #, p < 0,05 im Vergleich zu unbestrahlten unbehandelten MDA-MB-231-Zellen. \$, p < 0,05 bestrahlte 4-MU-behandelte MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zu unbestrahlten 4-MU-behandelten MDA-MB-231-Zellen. o, p < 0,05 bestrahlte 4-MU-behandelte MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zu bestrahlten unbehandelten MDA-MB-231-Zellen.

6.1.9. Zusammenfassung RHAMM in der Strahlenantwort

Zusammenfassend zeigte sich, dass sowohl p53 als auch RHAMM bei der Strahlenantwort von Mammakarzinomzellen eine wichtige Rolle zukommt. In MCF-7-Zellen, welche Wildtyp-p53 exprimieren, führte ionisierende Strahlung zu einer Induktion von p53, welche möglicherweise über eine Reduktion von RHAMMv1/2 den strahlensensitiven Phänotyp von MCF-7-Zellen vermittelt. Im Gegensatz hierzu verfügen MDA-MB-231-Zellen über mutiertes p53 und eine konstitutiv verminderte Expression von RHAMMv1/2, welche vermutlich für die Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung verantwortlich ist. Die pharmakologische Intervention mit 4-MU, einem RHAMM-Liganden-Inhibitor, führte sowohl in Zellen mit Wildtyp-p53 als auch in Zellen mit mutiertem p53 zu erhöhter Apoptose, wenn diese ebenfalls bestrahlt wurden.

6.2. Rolle des Tumorstromas in der Strahlentherapie

Tumore sind charakterisiert als heterogenes Gewebe, welches aus mehreren Zelltypen zusammengesetzt ist. Das Tumor-Stroma beinhaltet Fibroblasten, Endothelzellen sowie Immunzellen, welche häufig maßgeblich am Tumorwachstum beteiligt sind. Die Zusammensetzung der Matrix wird demnach nicht alleinig durch die Expression in den Tumorzellen bestimmt, sondern vielmehr durch die umliegenden stromalen Zellen. Aus diesem Grund sollte im Folgenden der Einfluss von Tumor-Stroma-Interaktion auf den Bestrahlungseffekt untersucht werden.

6.2.1. Apoptoseinduktion durch Fibroblasten

Die Untersuchung des Einflusses von matrixabhängigen Tumor-Stroma-Interaktionen auf die Strahlensensitivität erfolgte unter Verwendung von Ösophaguskarzinom-Zelllinien sowie stromaler Fibroblasten. Um die unterschiedliche Wirkung bestrahlter und unbestrahlter Fibroblasten auf die Strahlenantwort der Tumorzellen detailliert herausarbeiten zu können, wurden sowohl Fibroblasten als auch die Ösophaguskarzinomzellen separat kultiviert und bestrahlt. Anschließend wurden die Fibroblasten vom Zellboden abgelöst und mit den Tumorzellen kokultiviert. 72 h nach der Bestrahlung und 48 h nach Kokultivierung wurde der Einfluss der Bestrahlung und der Kokultur auf die Apoptoserate der unterschiedlichen Zellarten untersucht. Hierzu wurden folgende Methoden verwendet: 1) Zeitraffer-Mikroskopie 2) sub-G1-Messungen 3) Hoechst-PI-Lebendzellfärbungen und 4) PARP-Spaltung im Western-Blot (Abbildung 22). Es konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Dosis ionisierender Strahlung nicht zu einer erhöhten Apoptoserate in Fibroblasten führt sowie nur einen leichten (nicht signifikanten) Anstieg in KYSE410-Zellen bewirkt. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von nicht bestrahlten Fibroblasten zu bestrahlten Tumorzellen zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate – für 1) $7,47 \pm 0,87$, für 2) $7,15 \pm 1,40$, für 3) $3,96 \pm 1,25$ und für 4) $1,46 \pm 0,36$ im Vergleich zu unbestrahlten Tumorzellen; Mittelwert \pm SEM. Diese wurde weiter erhöht, wenn beide Zellarten zuvor bestrahlt wurden – für 1) $16,57 \pm 1,85$, für 2) $19,65 \pm 3,10$, für 3) $8,34 \pm 2,83$ und für 4) $2,27 \pm 0,11$ im Vergleich zu unbestrahlten Tumorzellen; Mittelwert \pm SEM – (Abbildung 22).

6 Ergebnisse

Neben der Ösophaguskarzinom-Zelllinie KYSE410 (esophageal squamous-cell carcinoma, ESCC) konnte diese Beobachtung auch in OSC-1 Zellen gezeigt werden (Abbildung 23).

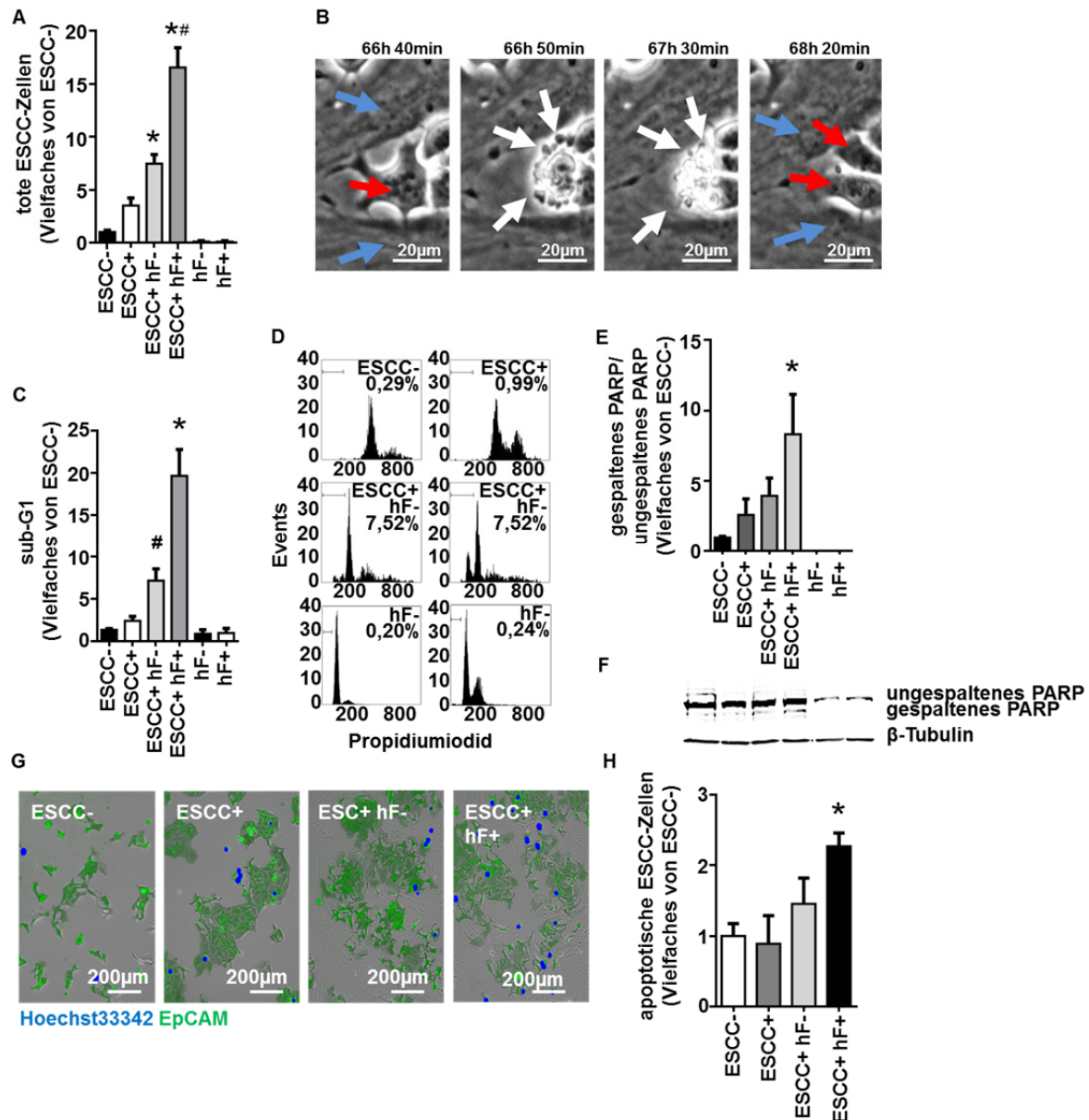


Abbildung 22: Bestrahltes Stroma verstärkt die Apoptose von KYSE-410 Tumorzellen. A, Zeitraffermikroskopische Auswertung des Tumorzellsterbens mit B, repräsentativen, vergrößerten Aufnahmen von einer absterbenden Tumorzelle (rote Pfeile), die von Fibroblasten (blaue Pfeile) umgeben ist in einer Zeitabfolge von 100 min. Die zeitraffermikroskopischen Aufnahmen wurden 24 h nach Ansetzen der Kokultur und somit 48 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy für weitere 24 h gestartet. n = 4. C, Sub-G1-Analyse mit D, repräsentativen Histogrammen. n = 4. E, Analyse der PARP-Spaltung mit F, repräsentativen Western-Blots und G, repräsentative Aufnahmen der Hoechst/PI-Lebendzellfärbung mit apoptotischen Zellen (blau) und einer Kofärbung mit EpCAM (grün) als Marker für die epithelialen Tumorzellen sowie H, deren Quantifizierung. Die Kokultur wurde hier 48 h nach Ansetzen der Kokultur geerntet bzw. gefärbt. n = 4. Mittelwert \pm SEM. -, 0 Gy; +, 2 Gy. *, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC- und #, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC+ hF+.

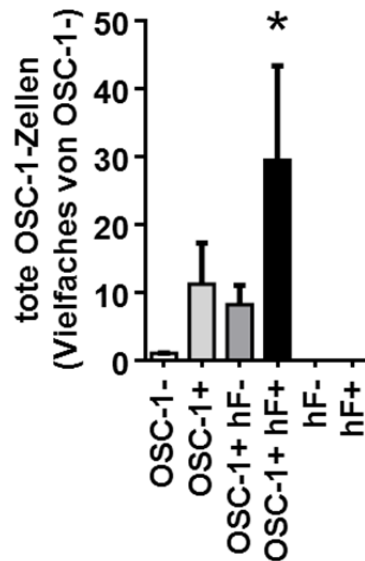


Abbildung 23: Bestrahlte Fibroblasten verstärken die Apoptose von OSC-1 Tumorzellen. Zeitraffermikroskopische Auswertung von OSC-1-Zellen in Kokultur mit Fibroblasten. Die Aufnahmen starteten 24 h nach Ansetzen der Kokultur für weitere 24 h. n = 6. Mittelwert \pm SEM. -, 0 Gy; +, 10 Gy. *, $p < 0,05$ im Vergleich zu unbestrahlten Tumorzellen.

6.2.2. Fibroblasten-vermittelter Tumorzelltod ist abhängig von direktem Zell-Zell-Kontakt

Unterschiedliche Arten der Zell-Zell-Kommunikation sind in der Literatur beschrieben. Zelluläre Kommunikation kann unter anderem durch 1) sezernierte/sekretierte Faktoren, z.B. Zytokine aber auch Exosomen 2) perizellulär an der Zelle befindliche Faktoren, wie beispielsweise Bestandteile der extrazellulären Matrix und/oder 3) direkten Kontakt, etwa durch *gap junctions* vermittelt werden. Im Folgenden wurden daher alle drei Möglichkeiten im *in vitro* Modell untersucht. Die Hypothese, dass sezernierte Moleküle der Fibroblasten möglicherweise die Fibroblasten-induzierte Apoptose der Tumorzellen vermitteln, wurde durch Überstands- und Transwellversuche analysiert. Konditionierte Medienüberstände von unbestrahlten und bestrahlten Fibroblasten sowie von bestrahlten Kokulturen zeigten keine Apoptoseinduktion der Tumorzellen (Abbildung 24A). Auch in der indirekten Zellkultur, bei der die Fibroblasten in Einsätzen (Transwell) über den Tumorzellen kultiviert wurden und somit ein direkter Zell-Zell-Kontakt ausgeschlossen wurde, konnte keine vermehrte Apoptose der Tumorzellen nach Bestrahlung beider Zelllinien detektiert werden (Abbildung 24B).

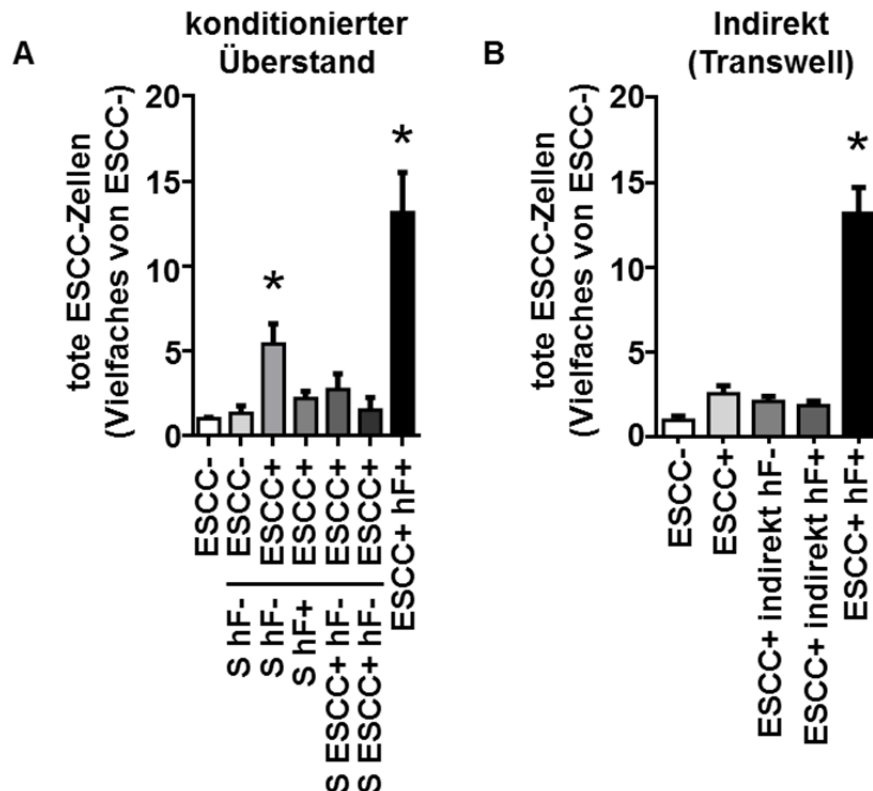


Abbildung 24: Direkter Zellkontakt vermittelt Fibroblasten-induziertes Tumorzellsterben. A, Zeitraffermikroskopische Aufnahmen von KYSE410-Zellen, die mit Fibroblasten- und Kokulturüberständen stimuliert wurden. Die Überstände wurden 48 h nach Ansetzen der Kokultur bzw. 48 h nach Scheinkokultivierung (Fibroblasten alleine) abgenommen und die Tumorzellen mit dem konditionierten Überstand stimuliert (vgl. Versuchsaufbau Abbildung 4). Nach 24 h wurde die zeitraffermikroskopische Aufnahme gestartet. $n = 6$. B, Zeitraffermikroskopische Aufnahmen von Tumorzellen, die in der indirekten Kokultur mit Fibroblasten in Einsetzen kultiviert wurden. 24 h nach dem Ansetzen der Kokultur wurde die Apoptoserate durch Zeitraffer-Mikroskopie bestimmt. $n = 6$. Mittelwert \pm SEM. -, 0 Gy; +, 2 Gy; S, konditionierter Überstand. ESCC+ hF+, direkte Kokultur. *, $p < 0,05$ im Vergleich zu unbestrahlten Tumorzellen.

6.2.3. Einfluss von ionisierender Strahlung auf das stromale Hyaluronsäuresystem

HA ist ein Glykosaminykan und kann als perizelluläre Struktur an die Membran von Zellen gebunden vorliegen und so die Kommunikation zwischen zwei benachbarten Zellen beeinflussen. HA-Synthase-Isoformen können in verschiedenen Zelltypen differentiell exprimiert sein und werden durch verschiedene Stimuli differentiell reguliert (Itano & Kimata 2002). Ösophaguskarzinomzellen exprimieren *HAS2* und *HAS3*, wobei *HAS3* wichtig ist für adhäsionsunabhängiges Wachstum in Lymphknotenmetastasen-Zellen (Bullard *et al.* 2003). Fibroblasten exprimieren alle *HAS*-Isoformen, *HAS1* und *HAS3* jedoch nur schwach (Röck *et al.* 2014; Kuroda *et al.* 2001). Die C_t -Werte der qRT-PCR spiegeln sich in den Kuchendiagrammen

6 Ergebnisse

wieder (Abbildung 25). *HAS2*-Expression scheint in beiden Zelllinien als Hauptisoform vorzuliegen. Eine verstärkte Expression von *HAS3* in Tumorzellen konnte auch hier beobachtet werden.

Da HA eine wichtige Rolle in der Tumorprogression spielt und Veränderungen der Expression der Hyaluronsäuresynthasen (HAS) durch Bestrahlung bisher noch nicht untersucht wurden, erfolgte eine Bestrahlung der Tumorzellen und Fibroblasten. Nach 24 h wurde die mRNA-Expression der *HAS* analysiert. 48 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit Hilfe des HA-bindenden Proteins gefärbt und dadurch phänotypische Veränderungen der perizellulären HA-Struktur analysiert. RNA-Expressionsanalysen (Abbildung 26A) und Affinitätszytochemie (Abbildung 26B) zeigten, dass die *HAS*-Expression und die perizelluläre HA in Tumorzellen nach Bestrahlung unverändert waren. Fibroblasten hingegen wiesen deutliche Veränderungen der *HAS*-Expression auf. Eine $46,01 \pm 0,09$ %-ige Reduktion der *HAS2* bei gleichzeitiger erhöhter Expression von *HAS1* und *HAS3v4* konnte gezeigt werden. (Abbildung 27A). Die daraus resultierende Phänotypveränderung wurde auch in einer Reduktion Kabel-ähnlicher HA-Strukturen in affinitätszytochemischen Färbungen sichtbar (Abbildung 27B).

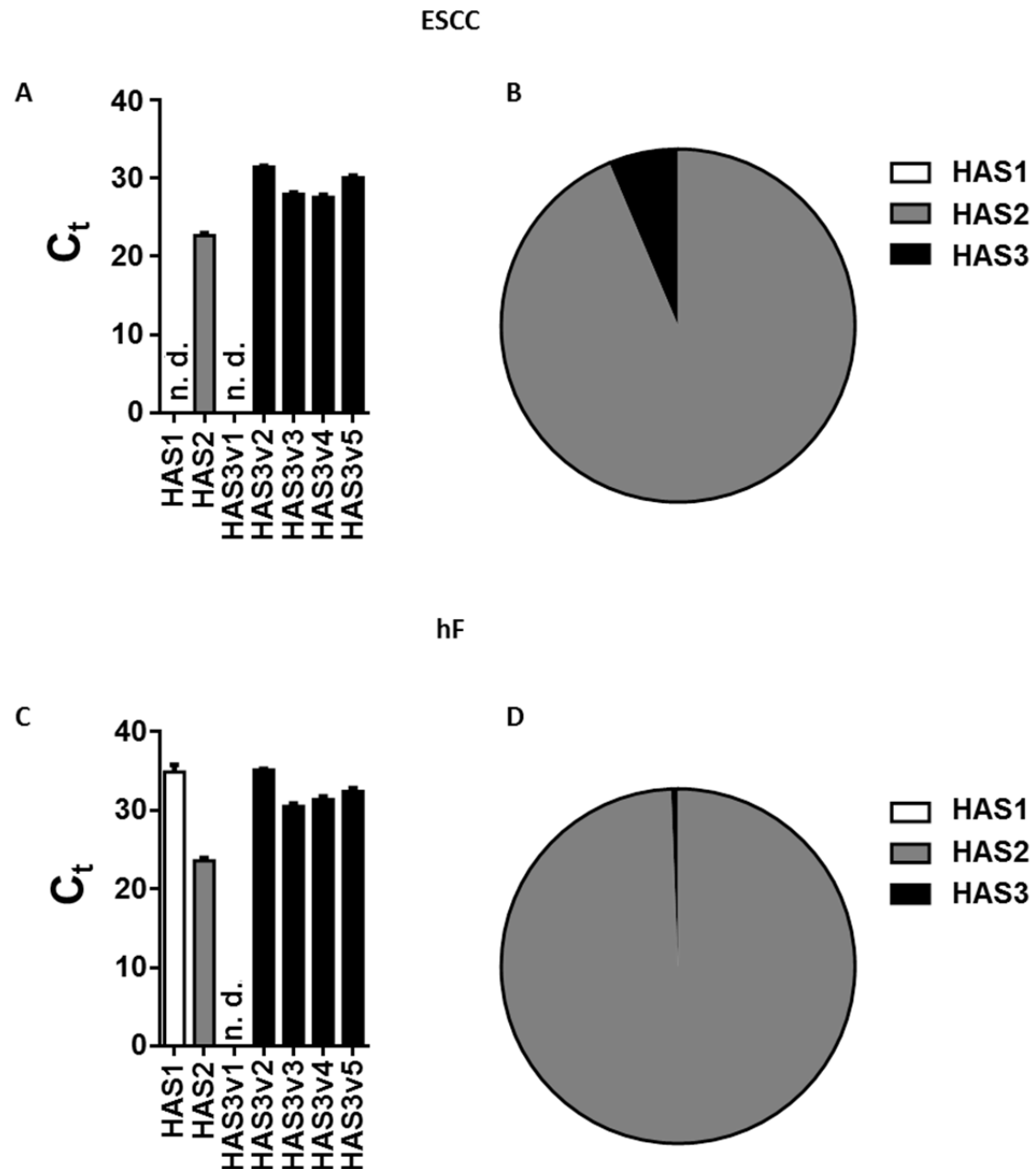


Abbildung 25: HAS-Expressionsprofil in ESCC und NHDF. A, zeigt die C_t-Werte der qRT-PCR-Experimente, die 48 h nach Aussaat der Tumorzellen analysiert wurden. B, Das Kuchendiagramm repräsentiert die HAS-Expressionsprofile für Tumorzellen. C, zeigt die C_t-Werte der qRT-PCR-Experimente, die 48 h nach Aussaat der Fibroblasten analysiert wurden. B, Das Kuchendiagramm repräsentiert die HAS-Expressionsprofile für Fibroblasten. Mittelwerte ± SEM.

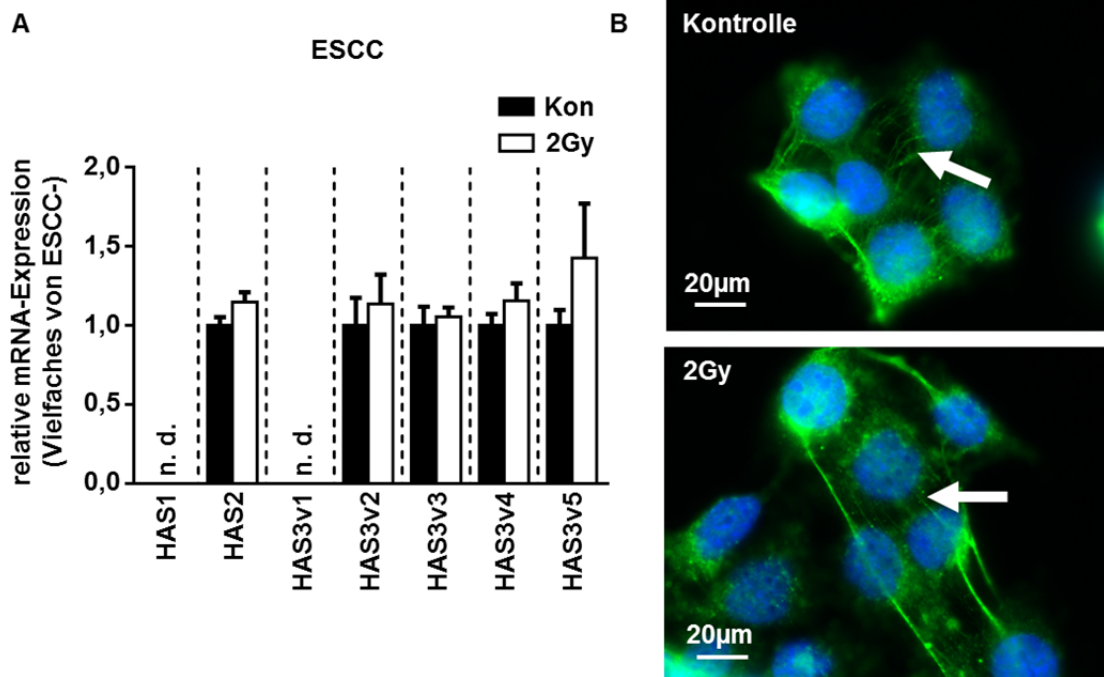


Abbildung 26: Hyaluronsäure-System in der zellulären Strahlenantwort. Zur Untersuchung der zellulären Strahlenantwort bezüglich des HA-Systems wurden Tumorzellen (ESCC) 24 h nach der Bestrahlung hinsichtlich der *HAS*-Expression untersucht und 48 h nach der Bestrahlung wurde die perizelluläre HA untersucht. A, Analyse der relativen *HAS* mRNA-Expression und B, affinitätszytochemischen HA-Färbung (grün) von Tumorzellen. Der Zellkern ist durch DAPI (blau) gefärbt. Die Pfeile zeigen Kabel-ähnliche HA-Strukturen. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM. n. d., nicht detektiert. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

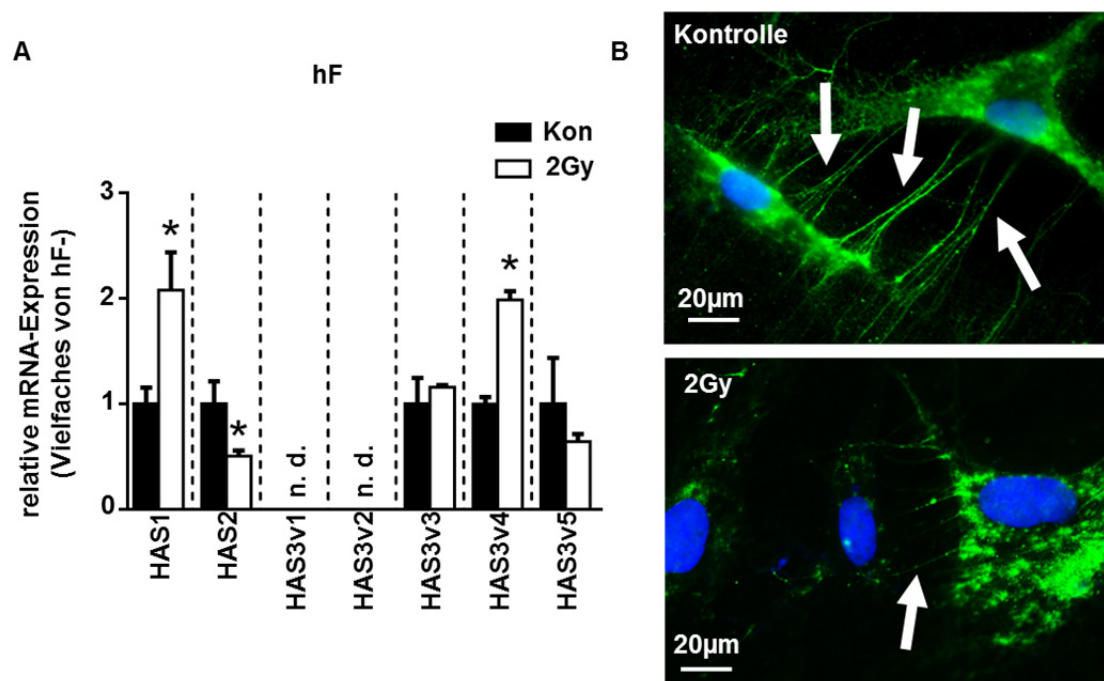


Abbildung 27: Hyaluronsäure-System in der zellulären Strahlenantwort. Zur Untersuchung der zellulären Strahlenantwort bezüglich des HA-Systems wurden humane Fibroblasten (hF) 24 h nach der Bestrahlung die *HAS*-Expression untersucht und 48 h nach der Bestrahlung wurde die perizelluläre HA angefärbt. A, Analyse der relativen *HAS* mRNA-Expression und B, affinitätszytochemischen HA-Färbung (grün) von Fibroblasten. Der Zellkern ist durch DAPI (blau) gefärbt. Die Pfeile zeigen Kabel-ähnliche HA-Strukturen. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM. n. d., nicht detektiert. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

6 Ergebnisse

Zur Untersuchung, ob eine *HAS2*-Reduktion in Fibroblasten Apoptose in Tumorzellen vermitteln kann, wurde *HAS2* in Fibroblasten mittels siRNA-Transfektion gegen drei unterschiedliche *HAS2*-Targetsequenzen gerichtet durchgeführt. In den siHAS2-transfizierten Fibroblasten konnte eine Reduktion der *HAS2*-Expression von $58,67 \pm 7,66$ %, $56,15 \pm 6,72$ % und $54,07 \pm 7,40$ % erreicht werden (Abbildung 28A). Bei der Kokultivierung mit bestrahlten Tumorzellen zeigte sich, dass eine Kokultivierung mit siKon-behandelten Fibroblasten eine Apoptoseinduktion von $5,69 \pm 1,26$ im Vergleich zu unbestrahlten Tumorzellen aufwies (Abbildung 28B). Die Kokultivierung mit siHAS2-transfizierten Fibroblasten zeigte eine Apoptoseinduktion von $13,86 \pm 1,97$, $13,17 \pm 1,88$ und $15,31 \pm 2,38$ im Vergleich zu unbestrahlten Tumorzellen (Abbildung 28B). Eine Reduktion von *HAS2* konnte somit, ähnlich wie in der Kokultur mit bestrahlten Fibroblasten, verstärkt Apoptose in Tumorzellen hervorrufen. Die Regulation von *HAS2* scheint somit einen wichtigen Punkt in der Signalkaskade für Fibroblasten-vermitteltes Tumorzellsterben darzustellen.

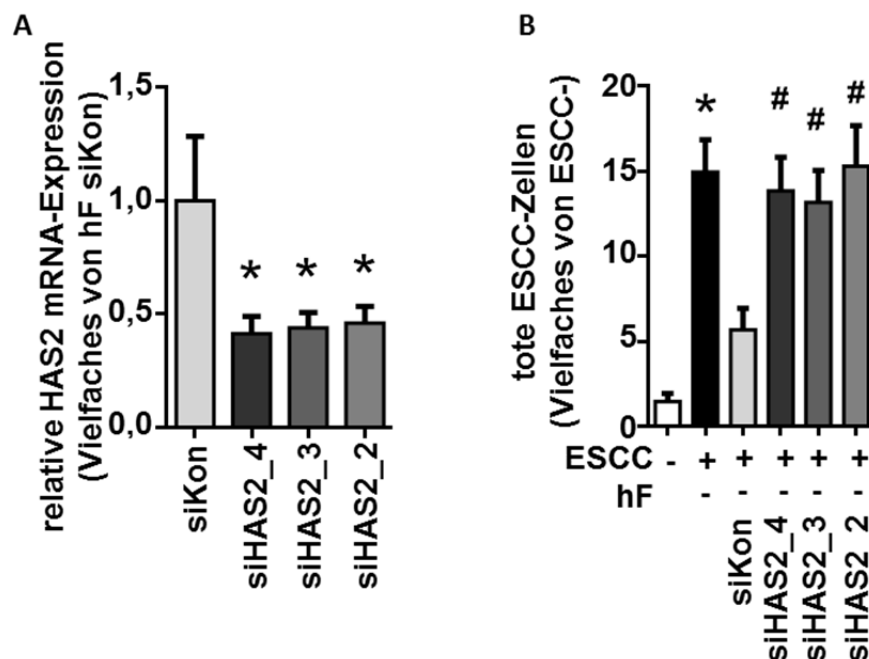


Abbildung 28: Stromale siRNA-Transfektion gegen *HAS2* induziert Tumorzellsterben. A, *Knock-down*-Effizienz auf mRNA-Ebene von drei verschiedenen siRNAs gegen *HAS2* gerichtet 48 h nach Transfektion. n = 4-6. B, Zeitraffermikroskopische Auswertung von Kokulturen mit siHAS2-behandelten Fibroblasten. Die zeitraffermikroskopischen Aufnahmen wurden 24 h nach dem Ansetzen der Kokultur durchgeführt. n = 5. Mittelwert \pm SEM. -, 0 Gy; +, 2 Gy. *, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC- und #, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC+ hF- siKon.

6.2.4. Reaktive Sauerstoffspezies vermitteln die Repression stromaler Hyaluronsäuresynthese 2

Einen weiteren wichtigen Faktor in der zellulären Strahlenantwort stellen reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) dar. ROS, wie Hydrogenperoxid und Superoxid, werden als Folge der Bestrahlung in der Zelle gebildet, was zum Zelltod durch Apoptose führen kann (Klammer *et al.* 2015). Im Kontext der zellulären Strahlenantwort wurde ein Zusammenhang zwischen ROS und HA bisher noch nicht evaluiert und folglich untersucht.

6.2.4.1. Radikalfänger können Fibroblasten-vermitteltes Tumorzellsterben inhibieren

Um zunächst festzustellen, ob erhöhte ROS-Level in den Kokulturen vorliegen, wurde intrazelluläres ROS bestimmt. 24 h nach der simulierten Kokultivierung (Absplitten der Fibroblasten) und 48 h nach Bestrahlung konnte weder in Tumorzellen noch in Kokulturen eine signifikant erhöhte ROS-Induktion nachgewiesen werden (Abbildung 29A). Auch durch die ROS-Messung mittels DHE wurden keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 29B). Fibroblasten zeigten erhöhte intrazelluläre ROS-Level. Sowohl mit der DCF-Messung als auch mit der DHE-Messung konnten erhöhte intrazelluläre ROS-Level in Fibroblasten detektiert werden (Abbildung 30A-C). Nach Vorstimulation mit Radikalfängern verblieb der intrazelluläre ROS-Spiegel auch nach Bestrahlung auf Basalniveau (Abbildung 30A). Allerdings führte die Behandlung mit NAC nicht zu einer Reduktion von Superoxiden (Abbildung 30B, 29C). Hieraus lässt sich schließen, dass alternative ROS hier eine Rolle spielen. So scheinen Hydrogenperoxide, Hydroxyl- und Peroxylradikale, die durch die DCF-Methode detektiert werden, diejenigen Faktoren zu sein, die Tumorzellsterben vermitteln.

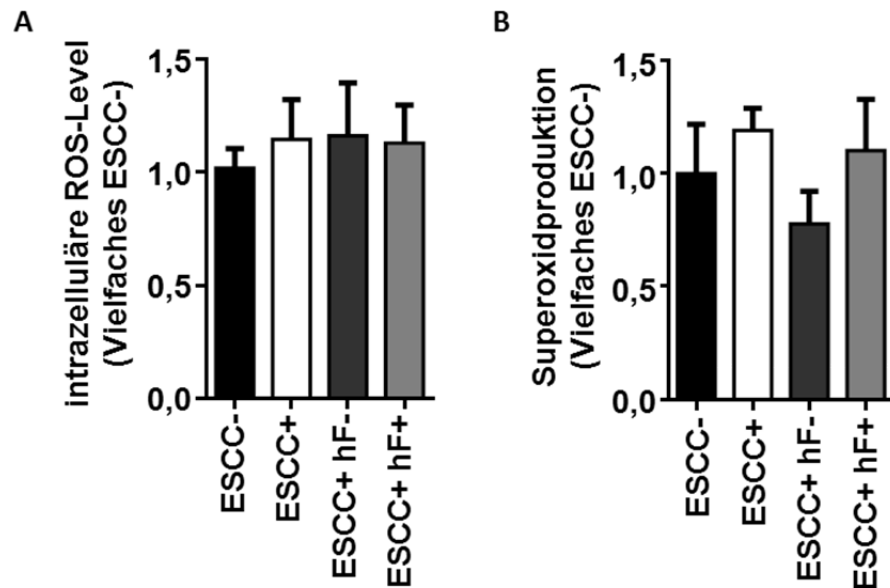


Abbildung 29: ROS-Level in Tumorzellen und Kokulturen mit Fibroblasten. Zur Evaluation, welche ROS-Level in Monokulturen und Kokulturen aus Tumorzellen und Fibroblasten vorherrschen, wurden die Zellen 24 h nach Kokultivierung mit A, der DCF-Methode und B, der DHE-Methode analysiert. n = 4, 6. Mittelwert \pm SEM. -, 0 Gy; +, 2 Gy.

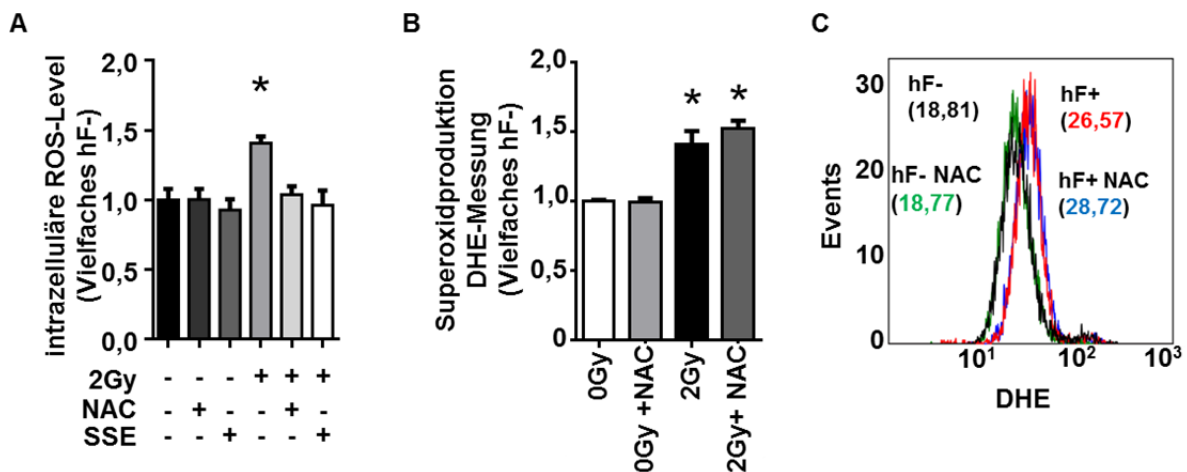


Abbildung 30: Gesteigerte ROS-Level in Fibroblasten können durch Radikalbildner inhibiert werden. Für die Untersuchung der intrazellulären ROS-Level in Fibroblasten wurden die Zellen 24 h nach scheinbarer Kokultivierung (Absplitten der Fibroblasten wie bei Kokultivierung durchgeführt) durch A, die DCF-Methode und (n = 5-8.) B, die DHE-Methode analysiert. (n = 7.) C, zeigt repräsentative Histogramme der DHE-Messung mit den zugehörigen Median der Fluoreszenzintensität. Mittelwert \pm SEM. -, 0 Gy; +, 2 Gy. *, p < 0,05 im Vergleich zu hF-.

Die Radikalfänger N-Acetylcystein (NAC) und Natriumselenit (sodium selenite, SSE) inaktivieren ROS. Zur Überprüfung, ob ROS eine Rolle im Fibroblasten-vermittelten Tumorzellsterben zukommt, wurde die Apoptoserate in Tumorzellen mittels Zeitraffer-Mikroskopie (Abbildung 31A) und sub-G1-Messung (Abbildung 31B) nach Kokultur mit bestrahlten und mit Radikalfänger-behandelten Fibroblasten durchgeführt. Es zeigte sich, dass NAC und SSE in der Lage waren, die Apoptoseinduktion in den

Tumorzellen zu unterdrücken. Die Analyse von PARP-Spaltprodukten und Hoechst/PI-Lebendzellfärbung verifizierten, dass die Fibroblasten-vermittelte Tumorzellapoptose durch Radikalfänger unterdrückt werden konnte (Abbildung 32).

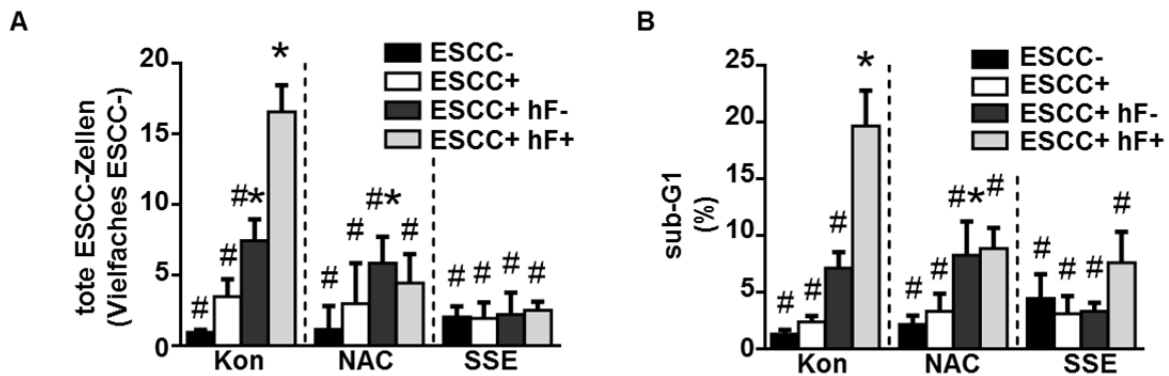


Abbildung 31: Radikalfänger können Fibroblasten-vermitteltes Tumorzellsterben unterdrücken. Die Radikalfänger N-Acetylcystein (NAC) und Natriumselenit (SSE) wurden 4 h (NAC) und 24 h vor der Bestrahlung eingesetzt. A, Zeitraffermikroskopische Auswertung (24 h nach Kokultur analysiert für weitere 24 h) und B, sub-G1-Analyse von Kokulturen, die mit Radikalfängern behandelt wurden und 48 h nach dem Ansetzen der Kokultur geerntet wurden. n = 4. Mittelwert \pm SEM. -, 0 Gy; +, 2 Gy. *, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC-. #, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC+ hF+.

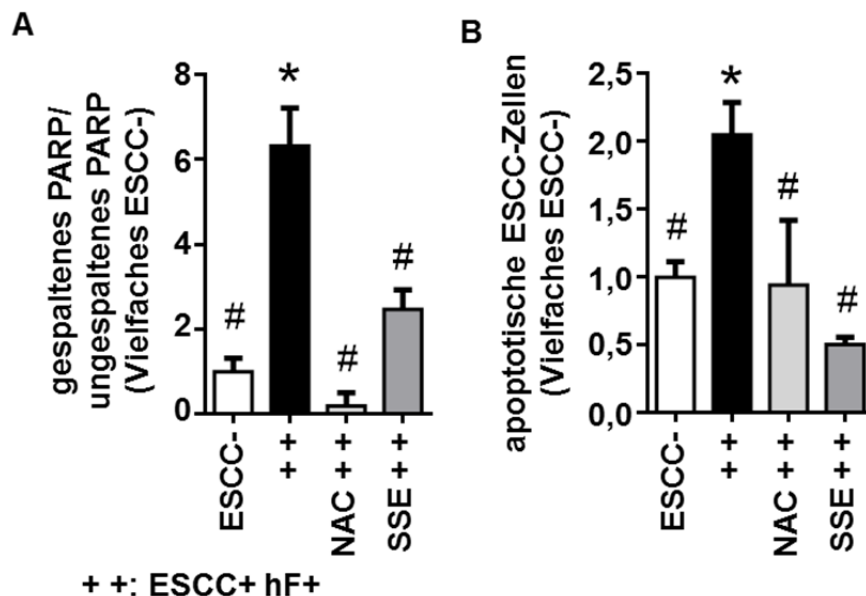


Abbildung 32: Radikalfänger können Fibroblasten-vermitteltes Tumorzellsterben unterdrücken. Die Radikalfänger N-Acetylcystein (NAC) und Natriumselenit (SSE) wurden 4 h (NAC) und 24 h vor der Bestrahlung eingesetzt. A, Hoechst/PI-Lebendzellfärbung und B, PARP-Spaltung von Kokulturen, die mit NAC und SSE behandelt wurden und 48 h nach dem Ansetzen der Kokultur geerntet wurden. n = 4. Mittelwert \pm SEM. -, 0 Gy; +, 2 Gy. *, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC-. #, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC+ hF+.

6.2.4.2. HAS2 ist ein *downstream-target* von ROS

ROS sowie HAS2 scheinen eine wichtige Rolle in der strahlenvermittelten Apoptoseinduktion von Tumorzellen zu spielen. In welchem Zusammenhang ROS und HAS2 zueinander stehen, sollte daher in weiteren Versuchen analysiert werden. Zunächst wurden siHAS2-transfizierte Fibroblasten mittels DCF-Methode auf ihre intrazellulären ROS-Level untersucht. Es konnte keine Regulation festgestellt werden (Abbildung 33). Die Herabregulation von HA scheint demnach keinen Einfluss auf die Entstehung von ROS zu besitzen.

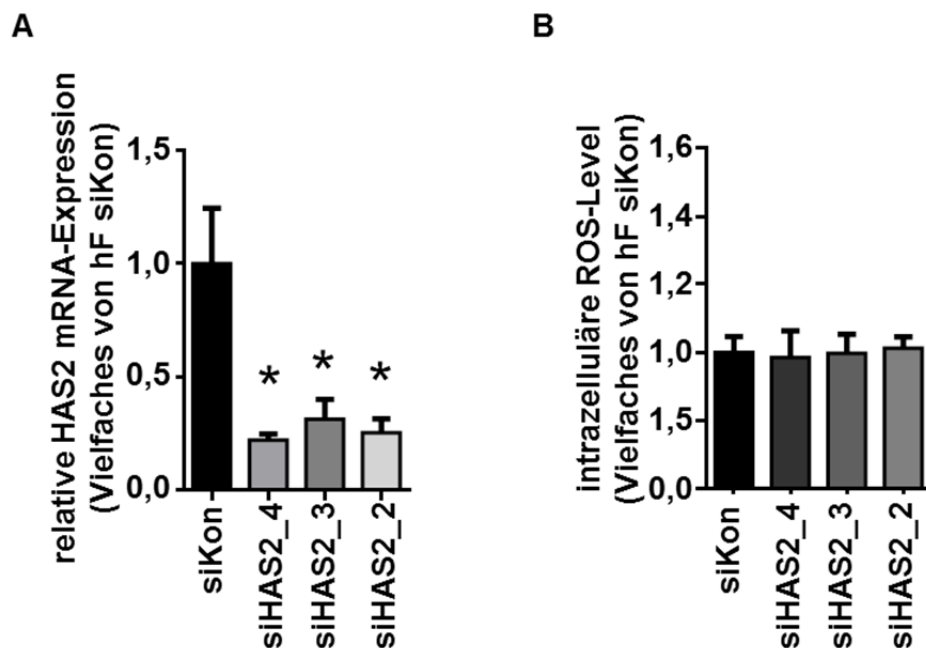


Abbildung 33: Herabregulation von HAS2 in Fibroblasten resultiert in basalen ROS-Leveln. Für die Untersuchung, ob eine Herabregulation von HAS2 in Fibroblasten die ROS-Bildung beeinflusst, wurden Fibroblasten mit drei verschiedenen siRNAs gegen HAS2 transfiziert. A, Transfektionseffizienz auf mRNA-Ebene 72 h nach der Transfektion und 24 h nach Schein-Kokultivierung (Absplitten der Fibroblasten wie bei Kokultivierung) von Fibroblasten. n = 4. B, Intrazelluläre ROS-Level in transfizierten Fibroblasten 24 h nach Schein-Kokultivierung gemessen mit der DCF-Methode. n = 4. Mittelwert \pm SEM. *, $p < 0,05$ im Vergleich zu hF- siKon.

Elesclomol induziert oxidativen Stress, indem es eine chelatbildende Verbindung mit Kupfer-(II)-Ionen eingeht und selektiv ROS in Mitochondrien bildet (Kirshner *et al.* 2008; Nagai *et al.* 2012). Die Stimulation mit Elesclomol induzierte in Fibroblasten erhöhte ROS-Level (Abbildung 34A-C) und führte zu einer reduzierten mRNA-Expression von HAS2 (Abbildung 34D). HAS2 scheint als nachgeschaltetes Zielprotein von ROS eine Rolle in der zellulären Strahlenantwort zu haben. Auch der konzeptionelle Versuch zeigte, dass die Herabregulation der HAS2 auf mRNA-Ebene

nach Bestrahlung durch NAC aufgehoben werden konnte (Abbildung 35A). Der Radikalfänger SSE konnte die *HAS2*-Regulation nicht umkehren (Abbildung 35B).

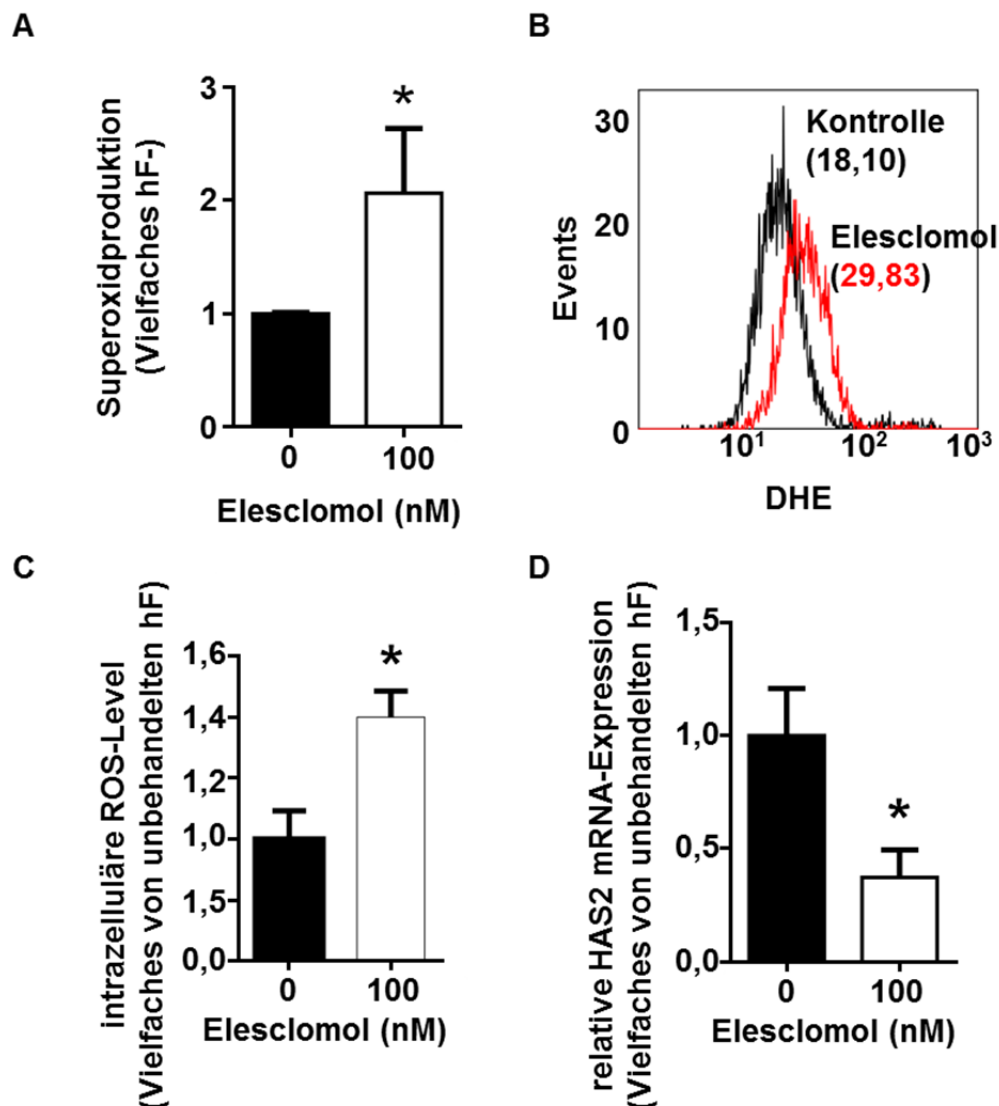


Abbildung 34: ROS-Induktion durch Elesclomol führte zu einer Herabregulation von *HAS2*. Zur Untersuchung, ob ROS-Induktion die *HAS2*-Expression verändert, wurden Fibroblasten mit 100 nM Elesclomol stimuliert und nach 48 h analysiert. Bestimmung der intrazellulären ROS-Level durch A, DHE-Methode mit (n = 4.) B, repräsentativen Histogrammen sowie C, der DCF-Methode (n = 4.). D, Zeigt die relative *HAS2* mRNA-Expression nach Stimulation mit 100 nM Elesclomol. n = 6. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu siKon-behandelten Fibroblasten.

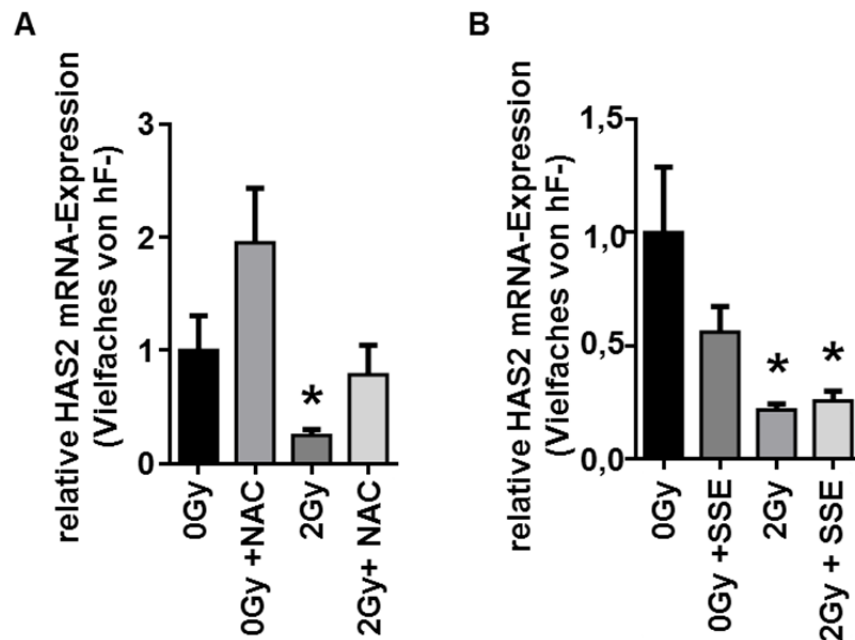


Abbildung 35: Relative HAS2 mRNA-Expression in bestrahlten Fibroblasten, die mit Radikalfängern stimuliert wurden. Die Radikalfänger N-Acetylcystein (NAC) und Natriumselenit (SSE) wurden 4 h (NAC) und 24 h vor der Bestrahlung eingesetzt. Die Fibroblasten wurden 24 h nach der Bestrahlung analysiert. Relative HAS2 mRNA-Expression von bestrahlten und mit A, NAC- oder B, SSE-behandelten Fibroblasten. n = 5. Mittelwert \pm SEM. *, p < 0,05 im Vergleich zu hF-.

6.2.5. Tunneling nanotubes als Mechanismus zur Hyaluronsäuresynthese 2-abhängigen Apoptoseinduktion in Tumorzellen

Für HA wurde gezeigt, dass es an der Ausbildung von zellulären Ausläufern beteiligt ist (Twarock *et al.* 2010). Zell-Zell-Kontakt über zelluläre Ausläufer, wie TNT, wurde in der Literatur beschrieben (Rustom 2004). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob HA einen Einfluss auf die Ausbildung von TNT hat und wie sich dies auf die strahlenvermittelte Apoptoserate der Tumorzellen auswirkt.

Cytochalasin B (CB) ist ein zellpermeabler Zytoskelett-Inhibitor, der die Bildung von Aktinfilamenten unterdrücken kann (Theodoropoulos *et al.* 1994). Eine geringe Konzentration CB kann zur Inhibierung von TNT genutzt werden (Bukoreshtliev *et al.* 2009). Die Behandlung mit CB wurde 24 h nach der Kokultivierung durchgeführt. Es konnte eine Reduktion der Apoptose in Tumorzellen festgestellt werden, die auf dem Apoptose-Niveau der Kokultur mit unbestrahlten Fibroblasten verblieb (Abbildung 37A-B). Es wurde festgestellt, dass die Ausbildung von TNT zu dem Schleusen einzelner Moleküle und Zellorganelle zwischen Zellen führen kann (Pasquier *et al.* 2013).

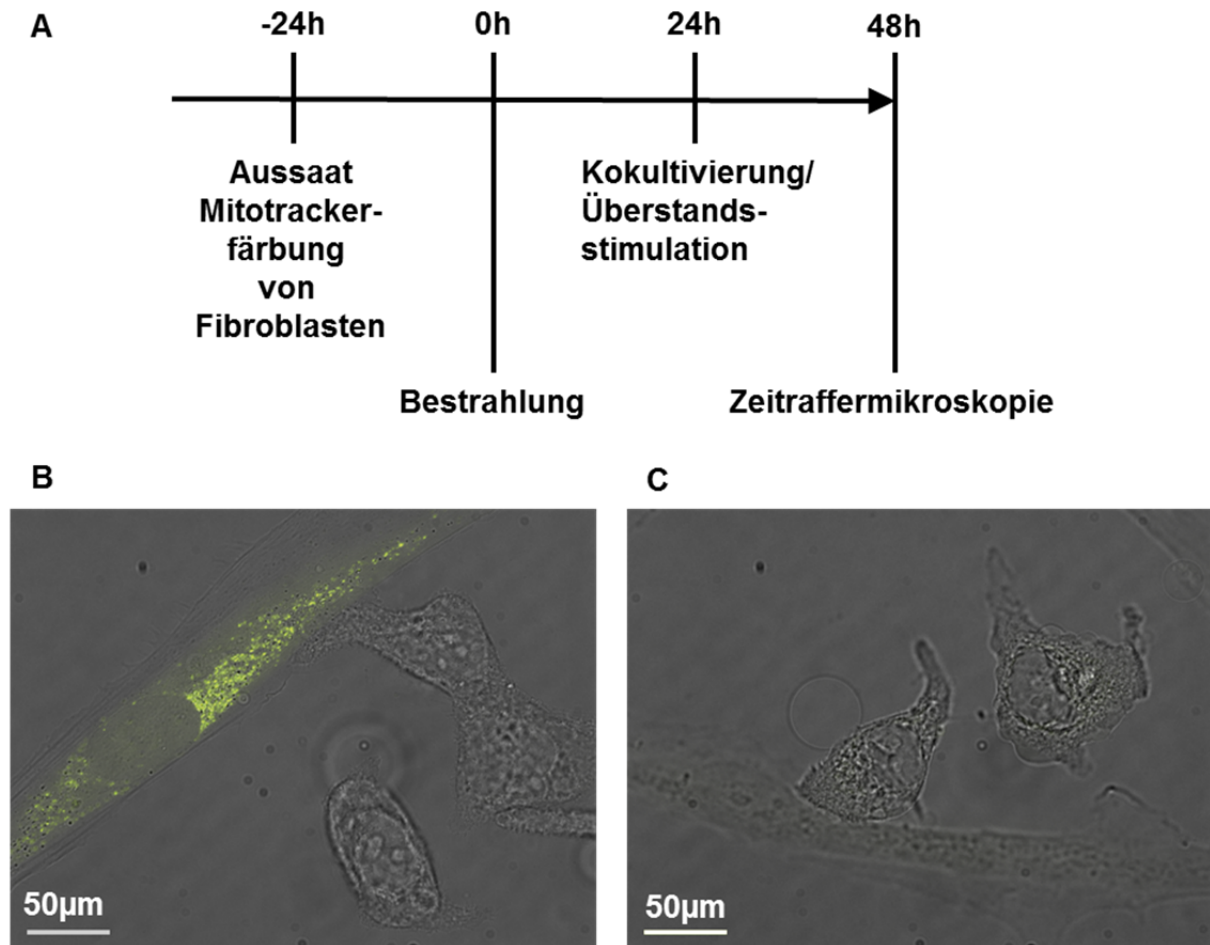


Abbildung 36: Überprüfung der Mitotracker-Färbung. **A**, Fibroblasten wurden bei der Aussaat mit Mitotracker gefärbt (gelb), nach Standardbedingungen kultiviert, bestrahlt und 24 h nachdem die Zellen wiederholt gesplittet wurden, wurde der Überstand auf bestrahlte Tumorzellen gegeben, um zu überprüfen, ob im Medium Farbstoffrückstände verbleiben, die unspezifische Färbungen in den Tumorzellen hervorrufen könnten. **B**, Kokultur aus Tumorzellen mit Mitotracker-gefärbten Fibroblasten. **C**, Kokultur aus Tumorzellen mit ungefärbten Fibroblasten und Überstand von Mitotracker-gefärbtem Fibroblasten-Überstand.

In zeitraffermikroskopischen Aufnahmen konnten TNTs in Kokulturen aus bestrahlten Tumorzellen und unbestrahlten Fibroblasten dargestellt werden (Abbildung 38A, 38D). Stromale Mitochondrien wurden mit Hilfe des Farbstoffes Mitotracker bei der Aussaat der Fibroblasten markiert. Überstandsversuche von gefärbten Fibroblasten zeigten keine unspezifischen Färbungen in Tumorzellen (Abbildung 36). Die Markierung von stromalen Mitochondrien zeigte, dass Mitochondrien zwischen den Fibroblasten und den Tumorzellen ausgetauscht wurden (Abbildung 38A-E), sowohl in Kokulturen aus bestrahlten (Abbildung 38B-C) als auch in Kokulturen mit unbestrahlten Fibroblasten (Abbildung 38E). Cluster von Mitochondrien konnten ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 38D). Eine Akkumulation von Mitochondrien wurde bereits mit oxidativem Stress und Zelltod in Zusammenhang gebracht (Luo *et*

al. 2013). Zur Untersuchung, ob das Tumorzellsterben durch Mitochondrien vermittelt wird, wurde Pifithrin- μ (PFT- μ) eingesetzt. PFT- μ ist ein selektiver Inhibitor der p53-Translokation an Mitochondrien (Strom *et al.* 2006). Er ist somit in der Lage, den mitochondrialen Apoptose-Signalweg zu unterdrücken. Bei Behandlung mit PFT- μ 24 h nach Ansetzen der Kokultur zeigte sich eine Reduktion des Fibroblasten-vermittelten Tumorzellsterbens (Abbildung 37). Das beobachtete Tumorstern scheint demnach durch mitochondriale Apoptose-Signalwege vermittelt zu sein.

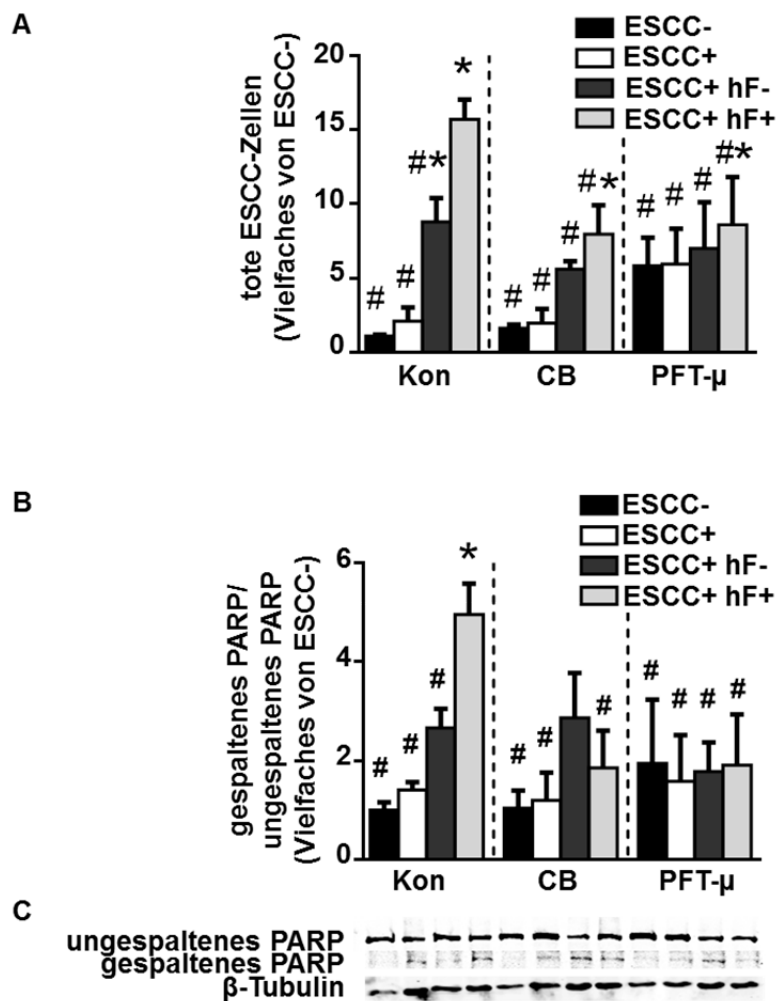


Abbildung 37: Inhibition von *tunneling nanotubes* und p53-Translokation in Mitochondrien unterdrückten Fibroblasten-vermitteltes Tumorzellsterben. Für die Inhibition von *tunneling nanotubes* (TNT) wurde Cytochalasin B (CB) in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Die Inhibition der p53-Translokation in Mitochondrien erfolgte durch die Behandlung mit Pifithrin- μ (PFT- μ) in einer Konzentration von 100 nM. Dies erfolgte 24 h nach der Kokultivierung. A, Zeitraffermikroskopische Auswertung der abgestorbenen Tumorzellen. n = 5. B, Proteinexpressionsanalyse der PARP-Spaltung via Western-Blot-Analyse mit C, repräsentativen Banden. n = 4. Mittelwert \pm SEM. -, 0 Gy; +, 2 Gy. *, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC- und #, p < 0,05 im Vergleich zu ESCC+ hF+.

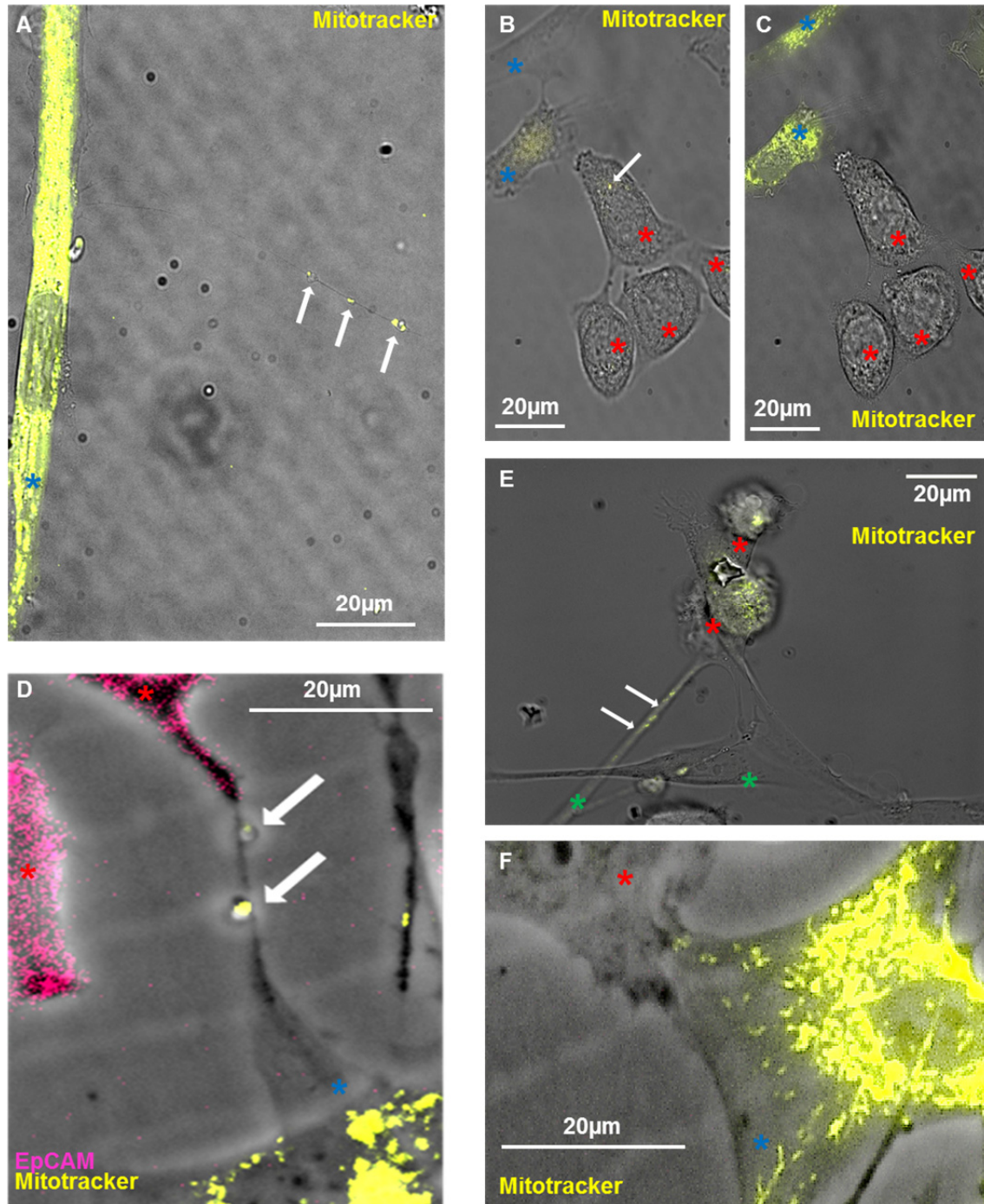


Abbildung 38: Tunneling nanotubes als möglicher Mechanismus, der Tumorzelltod durch direkten Zellkontakt der Tumorzellen mit Fibroblasten hervorrief. Zur Untersuchung, ob Mitochondrien von Fibroblasten in Tumorzellen geschleust werden, wurden Mitochondrien von Fibroblasten durch Färbung von Mitotracker (gelb) markiert und anschließend mit Tumorzellen kokultiviert. Die Aufnahmen zeigen Kokulturen aus bestrahlten Tumorzellen (rotes Sternchen) mit bestrahlten Fibroblasten (blaues Sternchen) oder unbestrahlten Fibroblasten (grünes Sternchen). A, Mikroskopische Aufnahme von unbestrahlten Fibroblasten. Die Pfeile deuten auf Mitochondrien, die sich innerhalb eines TNT befinden. B, Mikroskopische Aufnahme einer Mitotracker-positiven Färbung innerhalb der Tumorzelle (Pfeil). Der Fokus liegt hier auf den Tumorzellen. C, Zeigt dieselbe Position wie B im Fokus der Fibroblasten. D, Mikroskopische Aufnahme einer Kofärbung mit dem Epithelienmarker-EpCAM (pink) wodurch die Tumorzellen markiert sind. Der Pfeil deutet auf Mitochondrien, die innerhalb eines TNT liegen, der sich zwischen Tumorzelle und Fibroblast gebildet hat. E, Mikroskopische Aufnahme einer Kokultur, bei der sich an der Zell-Zell-Kontaktstelle zwischen Tumorzelle und Fibroblast vermehrt Mitochondrien des Fibroblasten ansammeln.

6.2.6. Zusammenfassung Tumorstroma in der Strahlenantwort

Zusammenfassend zeigte sich, dass Fibroblasten apoptotische Prozesse in Tumorzellen auslösen können. Bestrahlte Fibroblasten wiesen im Vergleich zu unbestrahlten Fibroblasten eine stärkere Apoptoseinduktion auf. Unbestrahlte Fibroblasten scheinen Apoptose über sezernierte Faktoren zu vermitteln. Bestrahlte Fibroblasten hingegen scheinen Tumorzellsterben durch direkten Zell-Zell-Kontakt zu induzieren. Es wurde nachgewiesen, dass ROS-Bildung in den bestrahlten Fibroblasten zu einer Reduzierung stromaler *HAS2* führt, welche sich als essentiell für den induzierten Tumorzelltod zeigte. In *HAS2*-reduziertem Stroma könnten die Bildung von TNTs und Initiierung mitochondrial-vermittelter Apoptose-Mechanismen darstellen, die dem Fibroblasten-vermittelten Tumorzellsterben zu Grunde liegen.

7. Diskussion

7.1. Strahlungsresistenzmechanismen

Seit der Entdeckung der Röntgenstrahlung 1895 durch Wilhelm Conrad Röntgen hat sich die Strahlentherapie zu einer wichtigen Behandlungsform bei Krebserkrankungen entwickelt. Die wissenschaftlichen Kenntnisse über strahlenbiologische Effekte haben enorm zugenommen. Dennoch sind Tumoren, die nicht auf Strahlentherapien ansprechen, keine Seltenheit (McBain *et al.* 2003). Die Suche nach Angriffspunkten und Substanzen, die radiosensitivierend wirken, ist von besonderem Interesse, um die Therapie effektiv und gleichzeitig die Toxizität für gesunde, nicht betroffene Organe so gering wie möglich zu halten (Bernier *et al.* 2004). Besonders Biomarker für intrinsische oder erworbene Resistenz von Tumorzellen werden benötigt, damit Strahlentherapien zu einer erfolgreichen Behandlung des Tumors führen. Mechanismen, die Strahlenresistenzen hervorrufen, sind vielfältig und noch nicht umfassend erforscht. Neuere Ansätze konnten durch die Identifikation bestimmter Gensignaturen das Ansprechen auf Strahlentherapien prognostizieren (Eschrich *et al.* 2009). Klinische Anwendungen von Gensignaturen sind vielversprechend, um Patienten individuell zu behandeln (Dewhirst & Chi 2013). Zu den Signalen, die Zellen vor zytotoxischen Effekten der Bestrahlung schützen, gehören z.B. HER-Rezeptoren, ERK1/2 und AKT (Hein *et al.* 2014).

Intrinsische Strahlenresistenz kann in Tumoren auftreten, die hypoxische Bereiche aufweisen. Hypoxische Tumorzellen sind gegenüber der strahlensensitivierenden Wirkung von Sauerstoff geschützt (Vaupel & Mayer 2007). Zudem exprimieren Tumor-Stammzellen verstärkt Radikalfänger-Systeme, wodurch sie radiosensitivere Eigenschaften aufweisen (Diehn *et al.* 2009). Weitere Mechanismen der Strahlenresistenz sind die Regulation des nuklearen Transkriptionsfaktors NF- κ B. NF- κ B- und CD44-(*cluster of differentiation 44*)-Expression konnten mit schlechter Strahlenantwort und kürzerem Gesamtüberleben korreliert werden (Bhat *et al.* 2013). Neue Untersuchungen vermuten zudem, dass der Verlust der zelleigenen Apoptoseinitiation Strahlenresistenzen hervorrufen kann (Chang *et al.* 2014).

Induzierte Strahlenresistenzen können durch die Strahlentherapie selbst verursacht werden. So beobachteten Phillips *et al.* (2006), dass die Anzahl an Tumor-Stammzellen nach Bestrahlung zunahm und diese Zellen strahlenunempfindlicher sind. Andere Studien wiesen nach, dass die Expression von transformierendem

Wachstumsfaktor β (TGF- β) wichtig für die DNA-Schadensantwort und für die Selbsterneuerung von Tumorzellen ist. Somit ist TGF- β an der Bildung eines strahlenresistenten Tumormikromilieus beteiligt (Zhang *et al.* 2011).

Zusammenhänge zwischen dem Tumormikromilieu und Strahlenresistenzen rücken die Notwendigkeit des Verständnis der Interaktion zwischen Tumorzellen und Stromazellen weiter in den Vordergrund (Barcellos-Hoff *et al.* 2005). Durch eine pharmakologische Modulation des Tumormikromilieus könnten neue Therapiemethoden etabliert werden, die die Effektivität und Verträglichkeit der Strahlentherapie verbessern.

7.2. RHAMM-Varianten in der zellulären Strahlenantwort

Der Hyaluronsäurerezeptor RHAMM besitzt zwei bekannte Funktionen: zum einen vermittelt er als intrazelluläres Protein das Beibehalten der mitotischen Spindelstabilität (Chen *et al.* 2014), zum anderen ist er über die Bindung an einen GPI-Anker mit der Zellmembran assoziiert (Liang *et al.* 2015) und fungiert dort als HA-Rezeptor, der Zellmotilität und Invasion vermittelt (Hamilton *et al.* 2007; Hall *et al.* 1995). Verschiedene Studien zeigten bereits, dass während der Tumorentwicklung RHAMM vermehrt exprimiert wird. Eine prognostische Korrelation konnte für verschiedene Tumorentitäten wie beispielsweise Leukämie, Blasen-, Prostata- und Mammakarzinome nachgewiesen werden (Crainie *et al.* 1999; Niedworok *et al.* 2013; Augustin *et al.* 2015; Tilghman *et al.* 2014; Zlobec *et al.* 2008; Ishigami *et al.* 2011; Hatano *et al.* 2013; Tzankov *et al.* 2011; Gust *et al.* 2009; C. Wang *et al.* 1998). In Tumorbiopsien von Brustkrebspatienten konnte die RHAMM-Expression zusätzlich mit Metastasen-freiem Überleben und Gesamtüberleben korreliert werden (Wang *et al.* 1998). RHAMM könnte daher einen therapeutischen Angriffspunkt für die Tumorthherapie darstellen. In ersten kleineren Studien wurde eine Vakzinierung gegen RHAMM zur Behandlung von akuter myeloischer Leukämie, vom multiplem Myelom und B-Zell-chronischer lymphatischer Leukämie eingesetzt (Schmitt *et al.* 2008; Greiner *et al.* 2010; Giannopoulos *et al.* 2010). Dennoch sind die Eigenschaften von RHAMM als prognostischer Marker und als therapeutischer Ansatz bislang nicht gesichert.

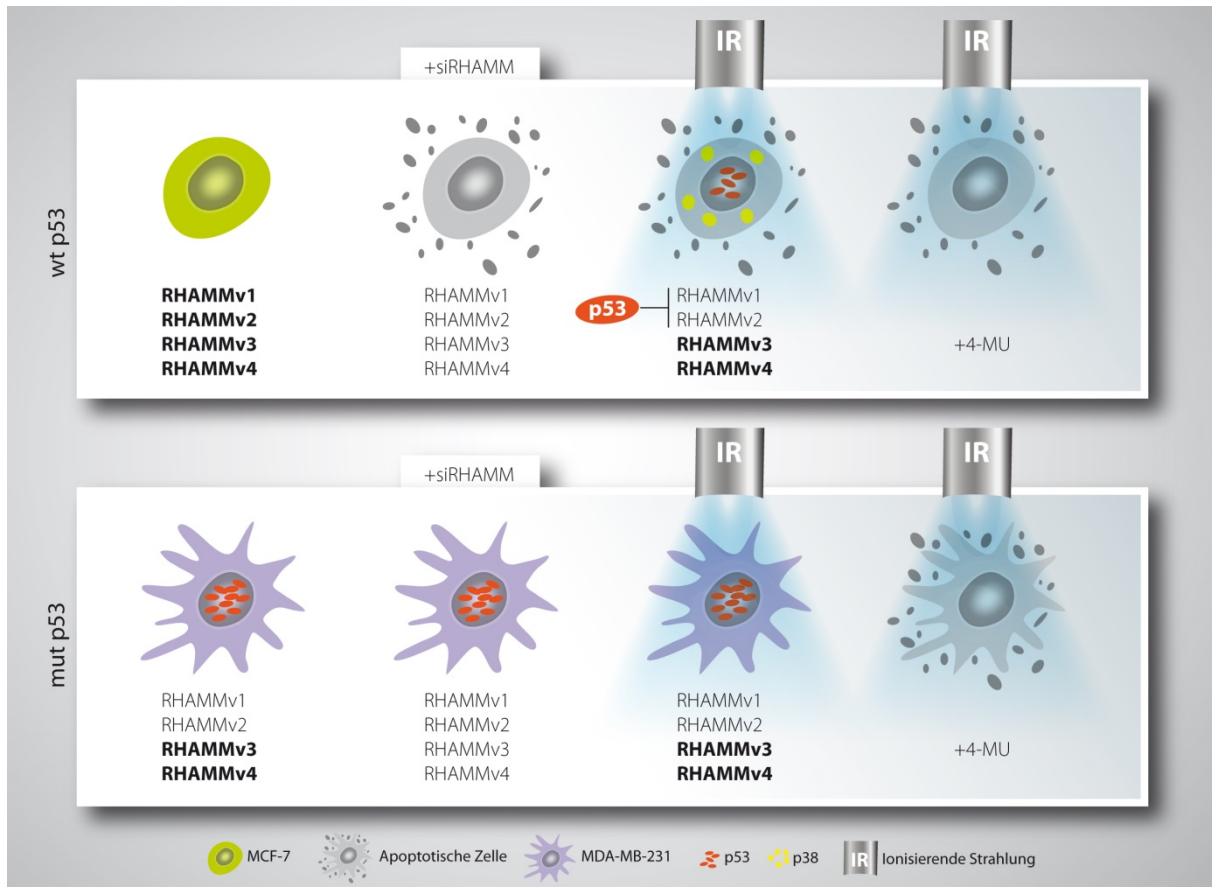


Abbildung 39: Zusammenfassende Abbildung zur Rolle von RHAMM für die Strahlenantwort von Mammakarzinomzellen. In Mammakarzinomzellen mit Wildtyp-p53 kann Apoptose durch RHAMM-Regulation oder Bestrahlung ausgelöst werden. Die Bestrahlung löst die Aktivierung von p38 und p53 aus. Durch die p53-Aktivierung kommt es zur Reduktion von RHAMMv1 und RHAMMv2, wodurch die Zellen apoptotisch werden. Eine Behandlung mit dem HA-Syntheseinhibitor 4-MU führt in Kombination mit Bestrahlung ebenfalls zu Apoptose. Mammakarzinomzellen mit mutiertem p53 werden weder nach Regulation von RHAMM noch durch Bestrahlung apoptotisch. Lediglich eine Behandlung mit 4-MU bei gleichzeitiger Bestrahlung konnte in den Zellen Apoptose auslösen. Die Graphik wurde von Cordula Schütze erstellt.

Eine Übersicht über die erlangten Ergebnisse ist in Abbildung 39 gezeigt. Die erlangten *in vitro*-Ergebnisse zeigten, dass die beiden verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien, MCF-7 und MDA-MB-231, unterschiedlich in Bezug auf Migration und Apoptose nach RHAMM- Reduktion reagierten. In MCF-7-Zellen scheint das zelluläre Überleben von RHAMM abhängig zu sein, wohingegen MDA-MB-231-Zellen eine RHAMM-Abhängigkeit bezüglich der Mobilität aufzeigten. Interessanterweise hatten MDA-MB-231-Zellen eine geringere basale RHAMM-Expression als die weniger aggressiveren MCF-7-Zellen. Eine mögliche Erklärung könnte in der zellulären Lokalisation von RHAMM begründet liegen. Hall *et al.* (1995) beschrieben bereits, dass eine Translokation von RHAMM zur Zellmembran in invasiveren Tumorzelllinien beobachtet werden konnte und somit eine Veränderung

der Migration mit sich brachte. Es kann daher vermutet werden, dass (1) die RHAMM-Expression wichtig für eine Krankheitsprognose ist, und dass (2) die subzelluläre Lokalisation von RHAMM ebenfalls Aussagen über das Invasionspotenzial und somit die Aggressivität des Tumors zulassen könnte.

Zelluläre Strahlensensitivität verändert viele Faktoren in der Zelle. Apoptotische Mechanismen, wie p53, FAS-vermittelte Signalwege oder die BCL-2-Genfamilie, sind Hauptsignalwege, die Strahlensensitivität vermitteln (Zhivotovsky *et al.*, 1999). Frühere Untersuchungen von endogener Apoptose und Radiosensitivität von Tumorzellen zeigten, dass diese nicht immer miteinander korreliert werden konnten (Sirzén *et al.* 1997; Belcheva *et al.* 1979). Es wurde dabei aber auch nachgewiesen, dass Zellen von radiosensitiven Tumoren *ex vivo* empfindlicher auf ionisierende Strahlung reagieren als Zellen, die aus strahlungsunempfindlichen Tumoren isoliert wurden (Olive & Durand 1997). Die *in-vitro*-Analyse der Apoptoseantwort könnte demnach als Assay genutzt werden, der die intrinsische Strahlensensitivität vorhersagen kann (Decaudin *et al.* 2002).

In dieser Arbeit wurden die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 auf ihre Strahlenempfindlichkeit bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy untersucht. Dabei wurde ein dreifacher Anstieg der Apoptoserate in MCF-7-Zellen beobachtet. Im Vergleich zu den MCF-7-Zellen zeigten sich MDA-MB-231-Zellen resistent gegenüber der Bestrahlungsdosis von 2 Gy. MCF-7-Zellen sind Caspase-3-defizient, können jedoch durch andere Signalwege Apoptose induzieren, wie durch die Caspase-7-abhängige Aktivierung mittels DNA-Fragmentierungsfaktor 40 (Devarajan *et al.* 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine p53 und p38 identifiziert, die in MCF-7-Zellen strahleninduzierten Zelltod auslösen. p53 könnte dabei das anti-apoptotische Protein Survivin regulieren (Mirza *et al.* 2002), wodurch Caspase 7 aktiviert und die Apoptose der Tumorzellen initiiert wird (Kappler *et al.* 2005). MDA-MB-231-Zellen tragen mutiertes p53-Gen (mut-p53), MCF-7-Zellen hingegen exprimieren Wildtyp-p53 (wt-p53) (Veiseh *et al.* 2014). Mutationen im p53-Gen sind die am häufigsten vorkommenden Mutationen, welche an der Tumorgenese beteiligt und in vielen Tumorentitäten wie (Stretch *et al.* 1991), Lungen- (Chiba *et al.* 1990), Darm- (Hinds *et al.* 1990) und Brustkrebs (Yamaguchi *et al.* 2015) vertreten sind. Im Allgemeinen sprechen Patienten, die eine Mutation im p53-Gen tragen, schlecht auf eine Strahlentherapie an (Lee & Bernstein 1993; Yamazaki *et al.* 2003). Zudem kann ein Therapiefehlschlag bei akuter myeloischer Leukämie in Rezidiven, die die p53-

Mutation tragen, resultieren (Chiarugi *et al.* 1998). Obwohl eine Korrelation zwischen p53-Mutationen und Strahlenresistenz für viele Tumorentitäten gezeigt wurde, führte die Korrelation in anderen Tumorentitäten zu gegensätzlichen Ergebnissen (McGregor *et al.* 2015). Die entscheidenden Mechanismen, denen die Strahlenresistenz durch p53 zugrunde liegt, müssen weiterhin untersucht werden. Es wird vermutet, dass unterschiedliche Punktmutationen differenzierten Proteinfunktionen zugeordnet sind (Kim & Deppert 2004). Zukünftig könnten demnach Analysen des Mutationsortes sowie der Mutationsart im p53-Gen Prognosen zur Strahlenresistenzen liefern.

In mRNA-Screenings konnte beobachtet werden, dass RHAMM herabreguliert wurde, wenn p53 aktiv vorlag (Spurgers *et al.* 2006; Kho *et al.* 2004; Rother *et al.* 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass p53 die RHAMM-Expression durch Bindung des ersten Exons und Introns von RHAMM reprimieren kann (Sohr & Engeland 2008). Die Hinweise, dass RHAMM das maligne Potenzial von Brustkrebs erhöht und als Effektorprotein von p53 fungiert, führten zur Untersuchung der Rolle von RHAMM in der Strahlenresistenz.

Diese Arbeit zeigt, dass *RHAMM* mRNA- und Proteinexpression in MCF-7-Zellen durch Bestrahlung reduziert wurde. Die *RHAMM*-Expression von MDA-MB-231-Zellen blieb hingegen unverändert. Die permanente Repression von *RHAMM* in mut-p53-tragenden Zellen könnte sich durch die Akkumulation von p53 im Nukleus erklären lassen. Obwohl postuliert wird, dass mut-p53 die Fähigkeit verloren hat, an p53-Binderegionen zu binden, konnte gezeigt werden, dass mut-p53 durch unterschiedliche Mechanismen in der Lage ist, Genexpression zu regulieren (Muller & Vousden 2014). Es wurde nachgewiesen, dass mut-p53 direkt an bestimmte Gene bindet oder mit Mitochondrien interagiert (Kim & Deppert 2004). Dabei können Mutationen in unterschiedlichen Domänen des p53-Gens auch unterschiedliche Funktionen hervorrufen (Muller & Vousden 2014). Hui *et al.* (2006) zeigten, dass die mut-p53-Variante in MDA-MB-231-Zellen für das Überleben der Zellen notwendig ist. Der vermittelnde Mechanismus ist derzeit noch ungeklärt, vermutet wird aber eine Beeinflussung von mut-p53 durch die Phospholipase D-Aktivität. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit siRNA gegen p53 in MDA-MB-231 Zellen zu einer Zunahme von RHAMM führte. Dies lässt die Annahme zu, dass mut-p53 in MDA-MB-231-Zellen seine Fähigkeit, RHAMM zu reprimieren, beibehalten hat.

MCF-7-Zellen, die durch Bestrahlung p53-abhängige Apoptose aufwiesen, zeigten eine Abnahme von RHAMMv1/2. Wildtyp-p53 kann daher vermutlich nur RHAMMv1/2 regulieren. Die Reduktion von RHAMM könnte zu einer verminderten Aktivität des ERK1,2-Signalwegs führen (Hatano *et al.* 2011). ERK1,2 wird unter anderem die Funktion der Förderung von zellulärem Überleben zugeschrieben und könnte somit in die Signalkaskade der RHAMM-abhängigen Tumorapoptose involviert sein (Chowdhury *et al.* 2014). Es konnte bereits gezeigt werden, dass *RHAMM*-Spleißvarianten unterschiedliche Eigenschaften aufwiesen. So wurde bei Patienten mit multiplem Myelom eine Erhöhung des Verhältnis von *RHAMMv3* zu *RHAMMv1/2* mRNA-Expression mit einer schlechten Prognose korreliert (Maxwell *et al.* 2004). Weiterhin wurde im Mausmodell nachgewiesen, dass RHAMMv3 Tumorwachstum und Lymphknotenmetastasen fördert (Du *et al.* 2011). Da das Proteinprodukt von RHAMMv1/2 länger ist als das von RHAMMv3 oder RHAMMv4, ist es denkbar, dass alternatives Spleißen von *RHAMM* die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation und somit auch unterschiedliche zelluläre Funktionen erklären könnte. Vermutet wurde eine Ähnlichkeit des Carboxylterminus von *RHAMM* mit der CD55, einem GPI-verankertem Protein (Savani *et al.* 1995). Da sich die *RHAMM*-Varianten allerdings nur in den Exons 1 bis 4, also innerhalb des Amino-Terminus, unterscheiden, liegt möglicherweise ein noch unbekannter Mechanismus für die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von RHAMM vor.

Der Einfluss von unterschiedlichen *RHAMM*-Spleißvarianten auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit wurde untersucht, indem die Mammakarzinomzellen mit siRNA gegen spezifische *RHAMM*-Spleißvarianten transfiziert wurden. Durch die Behandlung mit siRHAMMpan konnte gezeigt werden, dass MCF-7-Zellen eine Erhöhung des Zelltods aufwiesen. Obwohl in MCF-7-Zellen eine Erhöhung des Zelltods mit allen *RHAMM*-Spleißvarianten erzielt werden konnte, wies doch nur die Behandlung mit siRHAMMv1/2 einen additiven Effekt zur Bestrahlung auf. In MDA-MB-231-Zellen hingegen konnte nach Transfektion mit siRHAMMpan nur ein leichter Anstieg der in sub-G1 befindlichen Zellen detektiert werden. Zudem wurde aufgezeigt, dass in MDA-MB-231-Zellen nur die siRNAs gegen *RHAMMv3* und *RHAMMv4* einen Einfluss auf die Apotoserate haben. Diese führten jedoch nicht zu additiven Effekten durch gleichzeitige Bestrahlung. MDA-MB-231-Zellen, welche mut-53 tragen, wiesen eine permanent reduzierte RHAMMv1/2-Expression auf und könnten somit durch die noch vorhandene Expression von RHAMMv3 und

RHAMMv4 von anderen Signalwegen abhängig sein. RHAMMv3 und RHAMMv4 zeigten sich durch Bestrahlung nicht beeinflusst, was radioresistente Eigenschaften beider Spleißvarianten vermuten lässt. Aufgrund der Doppelwendelstruktur von RHAMM ist es möglich, dass RHAMM mit sich selbst assoziieren kann (Hall *et al.* 1995) und das Vorliegen von RHAMM als Heterodimer maßgeblich durch ein spezifisches Verhältnis der Spleißvarianten bestimmt wird. Daher könnte schon die Missregulation einer Spleißvariante schwerwiegende Einflüsse auf die Signalwege haben. Es ist weiterhin möglich, dass andere Signalwege bestehen, die ein Blockieren der RHAMMv3- und RHAMMv4-Signalwege kompensieren. Diese Schlussfolgerung wird dadurch unterstützt, dass sich RHAMM-*knock-out*-Mäuse normal entwickeln (Tolg *et al.* 2003).

CD44 ist ein Membranrezeptor, der für die Interaktion von Zell-Matrix-Kontakten zuständig ist. Eine Aktivierung von CD44 durch seine Liganden führt zu Zellproliferation und Migration (Hiraga *et al.* 2013). Widersprüchliche Funktionen von CD44 in Modellen der Tumorgenese und Tumorprogression wurden im Vergleich zu *in vivo*-Daten erhoben und könnten möglicherweise in der An- und Abwesenheit von RHAMM begründet sein (Maxwell *et al.* 2008). CD44 ist dafür bekannt, mit RHAMM Komplexe zu bilden. RHAMM kann den Verlust von CD44 kompensieren (Nedvetzki *et al.* 2004). Bisher konnte jedoch nicht bewiesen werden, dass umgekehrt CD44 auch den Verlust von RHAMM kompensieren kann (Tolg *et al.* 2010). Es steht außer Frage, dass sich CD44 und RHAMM in zwei Eigenschaften ähneln: Erstens konnte für beide gezeigt werden, dass sie durch p53 reguliert werden können (Sohr & Engeland 2008; Godar *et al.* 2008) und zweitens dass beide Rezeptoren an HA binden. HA ist ein Glykosaminoglykan und ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix.

Studien konnten bereits nachweisen, dass HA mit Brustkrebsprogression assoziiert ist (Edward *et al.* 2005). In Zellkulturexperimenten vermittelt HA Motilität und Überleben von Brustkrebszellen (Tzircotis *et al.* 2005; Auvinen *et al.* 2000). Es sollte daher getestet werden, ob der Verlust von HA durch die pharmakologische Inhibition der drei HA-Synthasen mit 4-Methylumbelliferon (4-MU) zur Sensibilisierung durch Bestrahlung führt. Tatsächlich konnte in MCF-7-Zellen ein additiver Effekt bezüglich der Apoptoserate unter Behandlung mit 4-MU gezeigt werden. MDA-MB-231-Zellen wurden durch die alleinige Behandlung mit 4-MU oder Bestrahlung nicht apoptotisch. Überraschenderweise konnte aber bei gleichzeitiger Behandlung von 4-MU und

Bestrahlung ein Apoptoseanstieg gezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen bezüglich der Rolle von CD44-RHAMM-Interaktionen im Kontext der Strahlensensitivität von Tumorzellen sollten durchgeführt werden, um Signalwege eindeutig identifizieren zu können. Hierbei könnten durch die Untersuchung von anderen Bindungspartnern, wie HER2 und MET (Ponta *et al.* 2003), neue Angriffspunkte zur Modulation der Strahlensensitivität identifiziert werden. Zudem rief die Behandlung von Ösophaguskarzinomzellen mit 4-MU bereits einen synergistischen Effekt in Kombination mit EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren hervor (Kretschmer *et al.* 2015) und impliziert daher, dass 4-MU auch bei anderen Tumorthérapien eine unterstützende Wirkungen haben kann.

Prognostische Marker helfen, onkologische Therapien zu verbessern und zu individualisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Detektion von RHAMM-Spleißvarianten in Abhängigkeit des p53-Mutationsstatus die Prognose der Strahlenempfindlichkeit bei Brustkrebs unterstützen kann. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Strahlenantwort in Tumoren gesteigert werden kann, wenn durch pharmakologische Intervention RHAMM oder sein Ligand HA blockiert werden.

7.3. Stroma-vermitteltes Tumorzellsterben

Bestrahlung kann über vier Mechanismen Zelltod vermitteln. (1) p53-induzierte Effekte nach Bestrahlung beinhalten Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Seneszenz und Apoptose (Helton & Chen 2007). p53 wird als „Wächter des Genoms“ aktiviert und reguliert apoptotische Faktoren, die schließlich zum Zelltod nach Bestrahlung führen. (2) Bestrahlung kann weiterhin durch Aktivierung des extrinsischen oder intrinsischen Zelltodes Apoptose vermitteln. Bei der extrinsischen Apoptose initiieren Todesliganden, wie die Tumornekrosefaktor-(TNF)-Familie, Apoptose. Bei der intrinsischen Apoptose modulieren pro- oder anti-apoptotische Faktoren durch Mitochondrienmembranpermeabilität Apoptose. p53 ist dabei ein wichtiger Regulator und nicht wie in (1) Initiator für die Induktion von pro-apoptotischen Bax-ähnlichen Proteinen (Jin & El-Deiry 2005). So steuert p53 beispielsweise die Repression von anti-apoptotischen BCL-2-ähnlichen Proteinen (Hoffman *et al.* 2002). (3) Bei der bestrahlungsvermittelten mitotischen Katastrophe sind die Zellen nicht mehr teilungsfähig. Durch DNA-Schäden und defekte Zellzyklusmechanismen (Eriksson & Stigbrand 2010) oder Hyperamplifikation von Zentrosomen können die Zellen sich

nicht mehr teilen und sterben (Eriksson *et al.* 2007). (4) Seneszenz ist ein weiterer Mechanismus, durch welchen bestrahlte Zellen ihre Teilungsfähigkeit verlieren. Die Zellen obliegen einem permanenten Zellzyklusarrest und zeichnen sich phänotypisch durch Vergrößerung, Abflachen und erhöhter Granularität aus (Stein & Dulic 1995). Tumorzellen können über eine Vielzahl von Mechanismen Apoptoseresistenzen ausbilden. Durch die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie BCL-2, BCL-XL und Survivin (Karpel-Massler *et al.* 2015; Yu *et al.* 2015) sowie die Unterdrückung von pro-apoptotischen Proteinen wie BAX und dem Tumornekrosefaktor-verwandtem Apoptose-induzierendem Liganden (TRAIL) wird Apoptose blockiert (Gillissen *et al.* 2013). Durch die Modulation von PI3K/AKT- und p53-Signalwegen können sich Tumorzellen ebenfalls der Apoptose entziehen (Busca *et al.* 2014; Maxwell & Davis 2000). In dieser Arbeit zeigten KYSE410-Zellen in Monokulturen eine geringe Apoptosezunahme durch die Bestrahlung, analoge Beobachtungen konnten bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (Li *et al.* 2014). KYSE410-Zellen tragen an Position 337 (Cystein statt Arginin) eine Mutation im p53-Gen (Fichter *et al.* 2011). Andere Studien wiesen nach, dass eine Mutation von p53 zu Strahlenresistenz führte und diese Zellen durch den veränderten p53-Status ihre Fähigkeit, Apoptose zu initiieren, verlieren (Lee & Bernstein 1993). Die Tatsache, dass die KYSE410-Zellen nur schwach auf die Bestrahlung reagieren, könnte demnach in ihrem p53-Status begründet sein.

Fibroblasten können bis zu einer Dosis von 50 Gy überleben und zeigen dann seneszente Charakteristiken (Papadopoulou & Kletsas 2011). Auch in dieser Arbeit zeigten sich Fibroblasten unempfindlich gegenüber einer Dosis von 2 Gy und 10 Gy. Eine Kokultur aus unbestrahlten Fibroblasten und bestrahlten KYSE410-Zellen oder OSC-1-Zellen induzierte allerdings Apoptose in den Tumorzellen, die wahrscheinlich durch sezernierte Faktoren ausgelöst wurde. Mechanismen, die Zelltod in Kokulturen beschreiben, sind als *bystander*-Effekte und interzelluläre Apoptoseinduktion (*intercellular induction of apoptosis*, IIA) bekannt (Desai *et al.* 2014; Portess *et al.* 2007). *Bystander*-Effekte beschreiben unabhängig vom Zelltyp die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen oder Mutagenese in den unbestrahlten Zellen durch benachbarte, bestrahlte Zellen. In der IIA induzieren normale Zellen die Elimination von transformierten Zellen (Abdelrazzak *et al.* 2011). Dass dabei sezernierte Faktoren eine Rolle spielen, zeigten bereits Mothersill & Seymour (1997). Hierbei scheint die Ausschüttung von TGF- β durch Fibroblasten eine besondere Stellung

einzunehmen. Durch die TGF- β -Ausschüttung kommt es zur Umgestaltung der extrazellulären Matrix und Faktoren, die an Inflammation und Fibrose beteiligt sind (Kamochi *et al.* 2008). Das metastatische Potenzial der Tumorzellen wird dabei erhöht, vermutlich auch unter Beteiligung von Integrinen (Levental *et al.* 2009). TGF- β -Bindung an seinen Rezeptor TGF- β R kann zudem Tumor-Strahlenresistenz vermitteln, indem es die Aktivierung von DNA-Schadensproteinen wie p53 und ATM beeinflusst (Kirshner *et al.* 2006; Andarawewa *et al.* 2007). TGF- β hat in geringen Dosen jedoch auch eine Tumor-unterdrückende Wirkung, indem es in Krebsvorläuferzellen Apoptose auslöst (Portess *et al.* 2007). TGF- β kann dabei sowohl autokrin als auch parakrin wirken und über Homologe von SMA und MAD (SMAD) pro-apoptotische Effekte auslösen (Jang *et al.* 2001). Kuhlmann *et al.* (2009) beschreiben in Fibroblasten jedoch erst ab einer Bestrahlung von 15 Gy eine TGF- β -Induktion. TNF- α -Sekretion von Fibroblasten könnte ebenso zu einer Induktion von Apoptose in Tumorzellen führen (Huang *et al.* 2015). Andere sezernierte Faktoren wie microRNAs (miR) sind in der Lage, Zelltod auszulösen. Es konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten miR-21 sezernieren, welche wiederum *Bystander*-Effekte auslöst (Xu *et al.* 2015) und möglicherweise den Grund für das induzierte Tumorzellsterben darstellen könnte.

Fibroblasten können nicht allein durch Bestrahlung ihren Phänotyp verändern, sondern auch durch ihre Nähe zu Tumorzellen. Man bezeichnet Fibroblasten dann als Tumor-assoziierte Fibroblasten (cancer-associated fibroblasts, CAF). Normalerweise produzieren CAFs tumorfördernde Moleküle wie Matrixmetalloproteasen, Zytokine, pro-angiogene Faktoren und Wachstumsfaktoren, wobei Faktoren wie Interleukin-6 (IL-6), Stromazell-abgeleiteter Faktor 1 (SDF-1) und TGF- β reguliert sind (Erez *et al.* 2010). Tumor-assoziierte Fibroblasten entwickeln sich ab etwa 5 Tagen nach Kultivierung mit Tumorzellen (Hinz *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden die Fibroblasten 48 h mit Tumorzellen kultiviert. Die Entwicklung von CAFs spielt daher vermutlich keine Rolle bei den beobachteten Effekten.

Bystander-Effekte und IAA verstärken sich mit zunehmender Zelldichte und weisen darauf hin, dass direkte Zellkontakte ebenfalls einen wichtigen Mechanismus darstellen (Zhou *et al.* 2008; Mariotti *et al.* 2015). *Gap Junctions* beispielsweise sind wichtige Vermittler von Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Effekten (Azzam *et al.* 2001). Kalziumionen, die vom endoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden, dienen als

7 Diskussion

Sekundärboten und werden durch *gap junctions* in die benachbarte Zelle transferiert, wo sie *Bystander*-Effekte hervorrufen (Lyng *et al.* 2011; Shao *et al.* 2006). Ein direkter Zell-Zell-Kontakt führte auch in dieser Arbeit in Kokulturen aus bestrahlten Fibroblasten und Tumorzellen zu einer verstärkten Apoptoseinduktion im Vergleich zu einer Kokultur mit unbestrahlten Fibroblasten. Eine Übersicht der erlangten Ergebnisse ist in Abbildung 40 gezeigt.

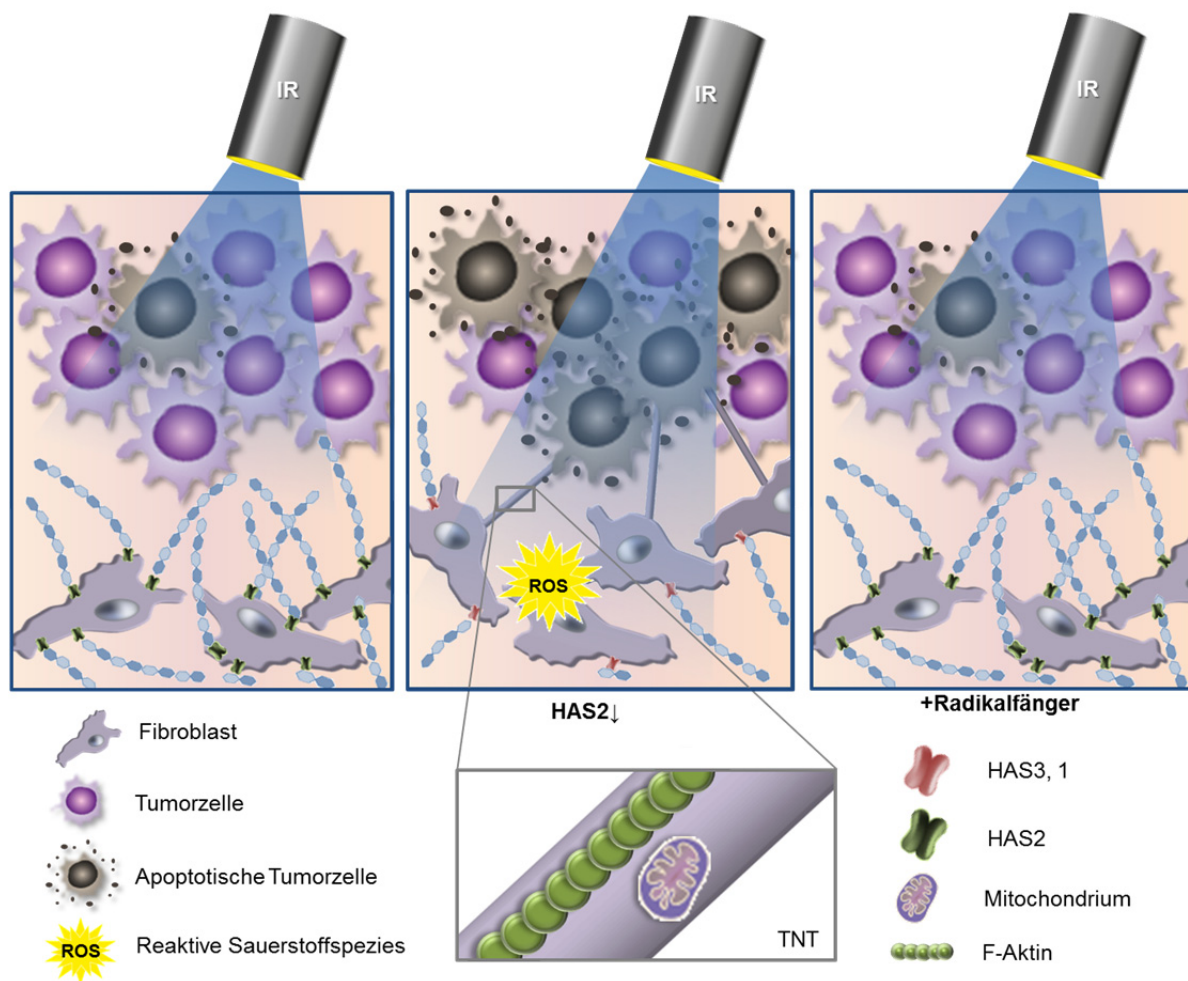


Abbildung 40: Zusammenfassende Abbildung der Kokultivierung von Fibroblasten mit bestrahlten Tumorzellen. Eine Kokultur aus bestrahlten Tumorzellen mit unbestrahlten Fibroblasten führte nur zu einer geringen Apoptoserate. Eine Kokultur aus bestrahlten Tumorzellen mit bestrahlten Fibroblasten hingegen führte zu einer Apoptosesteigerung. Bestrahlte Fibroblasten haben erhöhte ROS-Level. ROS reguliert HAS2 herunter und verursachte somit eine reduzierte stromale HA-Matrix. HA fördert die Ausbildung von *tunneling nanotubes* (TNT), die einen Austausch von Mitochondrien zwischen Fibroblasten und Tumorzellen erlauben. Der beobachtete Effekt ist ROS-abhängig, da Radikalfänger in der Lage waren das, Stroma-vermittelte Tumorsterben zu unterdrücken.

Bislang wurden Effekte der HA-Matrix und seiner Rezeptoren auf die Zell-Zell-Kommunikation nach Bestrahlung nur unzureichend untersucht. Für Hyaluronsäure wurden bereits pro-apoptotische Effekte beschrieben: Der HA-Rezeptor CD44 führte HA-vermittelt in T-Zellen zu Apoptose (Ruffell & Johnson 2008). Gleiches konnte

TLR4-abhängig *in vitro* (Leu *et al.* 2011) und CD44-abhängig *in vivo* bei Neutrophilen beobachtet werden (Takazoe *et al.* 2000). In dieser Arbeit zeigte das HA-System von Tumorzellen keine Regulation nach Bestrahlung, Fibroblasten hingegen wiesen eine Reduktion des Hauptisoenzyms *HAS2* sowie eine Zunahme von *HAS1* und *HAS3v4* auf. Eine Reduktion von *HAS2* könnte durch miR vermittelt sein. So exprimieren seneszente Fibroblasten vermehrt miR-23a-3p und begünstigen so HA-Matrix Reduzierung durch Verminderung von *HAS2* (Röck *et al.* 2014). Die Zunahme von *HAS1* sowie *HAS3v4* könnte kompensatorisch durch die Abnahme der *HAS2* bedingt sein (Mack *et al.* 2012; Wang *et al.* 2014b). Jedoch scheint im Speziellen die stromale *HAS2*-Regulation maßgeblich am Überleben der Tumorzellen beteiligt zu sein, da ein Verlust zu Zell-Zell-Kontakt-abhängiger Apoptose führte. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass HA Filopodien stabilisiert (Twarock *et al.* 2010). Es ist daher denkbar, dass *HAS2* einen Einfluss auf die Stabilität von *tunneling nanotubes* (TNT) hat, wodurch das Schleusen von Faktoren, die die *bystander*-Effekte vermitteln, beeinflusst werden könnte. TNT sind Mikrotubuli-enthaltende Membranbrücken zwischen Zellen und stellen einen neu entdeckten Mechanismus der direkten Zell-Zell-Kommunikation dar (Rustom 2004), der somit auch in der Tumor-Stroma-Interaktion von Bedeutung sein könnte.

ROS spielen sowohl beim *bystander*-Effekt als auch beim IIA eine wichtige Rolle (Portess *et al.* 2007; Klammer *et al.* 2015). Innerhalb von Sekundenbruchteilen nach der Bestrahlung bilden sich durch Radiolyse ROS, die bis auf Wasserstoffperoxid bereits nach 10^{-3} s wieder verschwinden (Riley 1994). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass ROS auch bis zu 6 h nach der Bestrahlung in immortalisierten Speicheldrüsen-Zellen erhöht vorliegen können (Tateishi *et al.* 2008). *In vivo* konnten sogar 7 bis 30 Tage nach Ganzkörperbestrahlung erhöhte ROS in Stammzellen nachgewiesen werden (Xu *et al.* 2015). In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten waren erhöhte ROS-Level noch 48 h nach der Bestrahlung in Fibroblasten detektierbar. Es ist daher denkbar, dass ROS ebenfalls an dem Stroma-vermitteltem Tumorzellsterben beteiligt sind. Durch die Behandlung mit den Radikalfängern N-Acetylcystein (NAC) und Natriumselenit (*sodium selenite*, SSE) war es möglich, das Tumorzellsterben zu verhindern. ROS scheinen daher wichtige Mediatoren für die beobachteten Effekte zu sein.

Erstmalig konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass *HAS2* ein Zielprotein von ROS ist und durch ROS herabreguliert wird. Einen schützenden Effekt von NAC auf

HAS2-Herabregulierung durch ROS konnten Lai *et al.* (2015) in Schweinezellen ebenfalls beobachten. SSE nimmt eine besondere Rolle ein. Es war zwar in der Lage, strahlungsinduzierte ROS abzubauen, allerdings konnte es nicht die *HAS2*-Reduzierung verhindern. Weiterhin verringerte SSE auch das Tumorzellsterben in Kokulturen mit unbestrahlten Fibroblasten, was mit NAC nicht beobachtet werden konnte. SSE ist ein indirektes Antioxidans, welches als Kosubstrat der Gluthation-Peroxidase ROS abbaut (Brigelius-Flohe & Maiorino 2013; Brozmanová *et al.* 2010). Möglicherweise gibt es neben dem stromalen *HAS2*-abhängigen Tumorzellsterben noch andere ROS-anhängige Mechanismen, die Apoptose in Tumorzellen hervorrufen kann. Es ist auch denkbar, dass *HAS2* nur indirekt Auslöser des Tumorzellsterbens ist und vielmehr die Regulierung von *HAS1* und *HAS3* verantwortlich für die Apoptoseinduktion ist.

Es zeigte sich, dass direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig ist, damit bestrahlte Fibroblasten erhöhte Apoptoseraten hervorrufen. Es wurden Membranbrücken beschrieben, die direkt Moleküle, ROS, Kalziumionen, Mitochondrien oder Proteine von einer Zelle zu einer benachbarten Zelle schleusen können (Ady *et al.* 2014; Austefjord *et al.* 2014; Gurke *et al.* 2008; Zhang & Zhang 2013; Rustom 2004). Bei der Stimulation von CB führte TNT-Blockierung zu vermindertem Tumorzellsterben und könnte somit ein Indiz für diesen Mechanismus sein. Zudem wurde für die Entstehung von TNT eine Abhängigkeit von p53 festgestellt (Wang *et al.* 2011). Die Behandlung mit PFT- μ (Unterdrückung der p53-Translokation ans Mitochondrium) verdeutlichte, dass der intrinsische Apoptoseweg am Stroma-vermittelten Tumorzellsterben beteiligt ist (Vaseva & Moll 2009). Es wird daher vermutet, dass das Übertragen von Mitochondrien einen möglichen Mechanismus dafür darstellt, weshalb direkter Zellkontakt Tumorzellsterben hervorruft (Wang & Gerdes 2015; Pasquier *et al.* 2013). In dieser Arbeit konnten stromale Mitochondrien in TNTs zwischen Tumorzellen und Fibroblasten beobachtet werden. Bisher wurde der Transfer von Mitochondrien mit Schutz vor Apoptose und Chemoresistenz in Verbindung gebracht (Wang & Gerdes 2015; Pasquier *et al.* 2013). Dabei wird vermutet, dass die Mitochondrien durch mitochondriale Rho GTPase 1 (Miro1) an das Motorprotein Kinesin-verwandtes Protein 5 (KIF5) gebunden werden und entlang von Mikrotubuli wandern können (Ahmad *et al.* 2014). Ein Zusammenhang zwischen Hyaluronsäure und TNT konnte in Mesotheliom-Zellen bisher nicht nachgewiesen werden (Ady *et al.* 2014). Möglicherweise können TNT aber in normalen

Stromazellen von der HA-Synthese abhängig sein. Die Tatsache, dass durch Akquirieren von mitochondrialer DNA Tumorzellen ihr tumorigenes Potential erhalten (Tan *et al.* 2015), lässt die Vermutung zu, dass auch andere Mitochondrien-abhängige Mechanismen wie beispielsweise Apoptose durch den Transfer von Mitochondrien in Tumorzellen hervorgerufen werden können. Bestrahlung führt zu einem Anstieg mitochondrialer ROS-Produktion (Leach *et al.* 2001; Yamamori *et al.* 2012). Werden diese geschädigten Mitochondrien in Tumorzellen transferiert, könnte die Zunahme von ROS in den Tumorzellen einen Schwellwert überschreiten, der dazu führt, dass die Mitochondrien ihre Zellintegrität verlieren und Apoptose einleiten (Sabharwal & Schumacker 2014).

Tumorstroma wurde bisher vorwiegend als tumorfördernd angesehen (Barker *et al.* 2015). Fibroblasten werden als tumor-assoziierte Fibroblasten (*cancer-associated fibroblasts*, CAF) zum Tumor rekrutiert, um das proliferative Potential beizubehalten (Cirri & Chiarugi 2012) und können funktionelle Eigenschaften wie epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), Invasion und Metastasierung vermitteln (Paunescu *et al.* 2011; Hanahan & Coussens 2012). So können beispielsweise Matrixmetalloproteasen 7 (MMP-7) und MMP-9 durch CAF Tumorprogression und Metastasierung fördern (Bai *et al.* 2015; Marshall *et al.* 2015). Das Signalprotein Hedgehog unterstützte durch CAF das Tumorstroma und die Tumor-Repopulation (Hwang1 *et al.* 2012; Gan *et al.* 2014). Therapien mit Matrixmetalloproteinase (MMP)- oder Hedgehog-(Hh)-Inhibitoren sollten stromale Fibroblasten des Tumors angreifen, führten in Studien allerdings zu keinem Vorteil gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden, da MMP fast ubiquitär in Tumorzellen überexprimiert werden und späte Tumorstadien möglicherweise nicht mehr MMP-abhängig sind (Junttila & de Sauvage 2013). Neuere Studien zeigten zudem, dass eine Stromaverminderung auch zu Tumorprogression führen kann und Pankreaskrebs-Patienten mit reduziertem Tumorstroma ein schlechteres Gesamtüberleben aufweisen (Ozdemir *et al.* 2014). In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass Fibroblasten das Tumorzellsterben nach Bestrahlung beeinflussen können. Es ist denkbar, dass Tumorstroma sowohl tumorfördernde als auch tumorhindernde Eigenschaften besitzt und ein Gleichgewicht aus beidem bestimmend für den Krankheitsverlauf sein kann.

Es besteht bisher noch Unklarheit zwischen dem Zusammenhang des p53-Status mit *bystander*-Effekten (Mothersill & Seymour 1997; Camphausen *et al.* 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *bystander*-Effekte sowohl in den p53-mutierten

KYSE410-Zellen aufgetreten sind, als auch in den Wildtyp-p53 OSC-1-Zellen und unterstützt somit die Hypothese, dass der p53-Status unabhängig von *bystander*-Effekten ist (Camphausen *et al.* 2003).

Die hier verwendeten Stromazellen sind normale Fibroblasten und stellen daher in Kokultur mit Tumorzellen ein frühes Tumorstadium nach. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Tumorstroma einen Einfluss auf Tumorapoptose hat. Es ist folglich nachvollziehbar, dass Stromazellen vermutlich einen Schutzmechanismus ausbilden, um transformierte Zellen zu eliminieren (Bissell & Hines 2011). Das Verständnis des Stroma-vermittelten Tumorzellsterbens könnte helfen, Tumorgenese zu unterbinden und möglicherweise präventiv Maßnahmen gegen die Krebsentwicklung liefern.

7.4. Ausblick

Das HA-System stellt einen guten Angriffspunkt dar, um Strahlentherapien zu verbessern. So konnte eine Modulation von RHAMM-Expression oder -Funktion die Apoptoserate erhöhen und durch die Regulation von *HAS2* in Fibroblasten war es möglich, Apoptose in Tumorzellen hervorzurufen.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem HA-System und p53 festgestellt werden. Trotz tiefgreifender Forschungsunterfangen hat p53 als prognostischer Marker bislang in der Klinik keine Anwendung gefunden. Zudem konnten klinische Studien, trotz Bestimmung des p53-Status, keinen eindeutigen Zusammenhang mit ausgebildeten Strahlenresistenzen nachweisen. Die Schwierigkeit liegt scheinbar darin, dass unterschiedliche Mutationen von p53 sowohl Funktionsgewinn als auch Funktionsverlust erzielen können. Man erhofft sich, durch eine genaue Identifizierung des Mutationsortes differenziertere Aussagen über p53-Mutationen treffen zu können, um daraus prognostischen Nutzen zu erzielen (Muller & Vousden 2014). Auch die therapeutische Modulation von nachgeschalteten Effektorproteinen könnte einen Zusatznutzen erbringen. Dies wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit anhand von RHAMM deutlich gemacht. Die Inhibition des RHAMM-Liganden HA mittels 4-MU war in der Lage, auch in den strahlenunempfindlichen MDA-MB-231-Zellen Apoptose zu induzieren. Zukünftige Untersuchungen an bestrahlten Patientenproben sollten daher auf eine mögliche Korrelation der RHAMM-Regulation in Bezug auf das Gesamtüberleben analysiert

werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob eine Kombinationsbehandlung aus 4-MU und Bestrahlung die Gesamtdosis einer Strahlentherapie, die notwendig ist, um den Tumor zu kontrollieren, herabsetzen kann und ob dadurch sogar strahlenresistente Tumore responsiv gegenüber Bestrahlung werden.

Es gibt Hinweise, dass RHAMM-Varianten unterschiedliche Funktionen und zelluläre Lokalisationen besitzen. Die weitergehende Untersuchung der RHAMM-Varianten könnte zudem nicht nur Aufschluss in Zusammenhang mit Tumorbiologie geben, sondern auch die Funktion von RHAMM bezüglich grundlegender biologischer Mechanismen im Zellzyklus, an dem es ebenfalls maßgeblich beteiligt ist, klären.

Des Weiteren sollte neben diesen Fragestellungen untersucht werden, ob HAS die Bildung von stromalen TNTs beeinflussen können, welche scheinbar für das Zell-Zell-Kontakt-abhängige Tumorzellsterben verantwortlich sind. Darüber hinaus muss geklärt werden, welche Faktoren durch TNT geschleust werden und ob möglicherweise tatsächlich Mitochondrien-Transport, vermittelt durch Fibroblasten, die beobachteten Effekte hervorruft.

Von weiterer Bedeutung wird die Untersuchung sein, ob der *in vitro* beobachtete Effekt auch *in vivo* relevant ist. Auvinen *et al.* (2014) zeigten bereits bei einer Brustkrebs-Patientenkohorte, die zu 89 % postoperativ bestrahlt wurde, dass eine hohe Expression von stromaler HAS2 mit einem schlechten kumulativen Überleben korreliert. Die Fragestellung, ob eine Bestrahlung die stromale HAS2 maßgeblich regulieren und so Tumorwachstum/Tumorapoptose beeinflussen kann, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Eine Intervention mit Substanzen, die ROS induzieren, könnten Strahlenresistenzen umgehen und möglicherweise Behandlungsmethoden für resistente Tumore bilden (Okon & Zou 2015).

Die Tatsache, dass die Expression von HAS2 auch bei Brustkrebs einen Einfluss auf das kumulative Überleben hat, verdeutlicht, dass möglicherweise die Stroma-induzierte Tumorapoptose auch in weiteren Tumorentitäten eine Rolle spielen kann.

8. Zusammenfassung

Aufgrund der weltweiten Zunahme von Krebserkrankungen stellt die Verbesserung onkologischer Therapien ein wichtiges Ziel kliniknaher Forschung dar. Die Strahlentherapie ist eine der drei Therapieformen für die Großzahl aller Krebsarten. Limitierungen einer erfolgreichen Strahlenbehandlung sind vor allem auf unterschiedliche Resistenzmechanismen zurückzuführen. Das Hyaluronsäure-(HA)-System ist Modulator einer Vielzahl an Tumorzell-Funktionen. Bislang ist jedoch nur wenig zu den Einflüssen von HA im Kontext von ionisierender Bestrahlung bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Hyaluronsäure-Synthasen (HAS) und der Rezeptor für HA-vermittelte Motilität (RHAMM) im Kontext der Strahlenantwort untersucht. Erstmals konnte gezeigt werden, dass strahlensensitive MCF-7-Zellen durch Bestrahlung mit 2 Gy RHAMMv1/2 herabregulieren und dadurch in diesen Zellen Apoptose induziert wird. Im Gegensatz hierzu zeigten strahlenunempfindliche MDA-MB-231-Zellen keine RHAMM-Regulation durch Bestrahlung. MCF-7-Zellen tragen Wildtyp-p53 und MDA-MB-231-Zellen ein mutiertes p53-Gen, was zu der Hypothese führt, dass der p53-Status der Zellen assoziiert ist mit der RHAMM-abhängigen Strahlenantwort. Die pharmakologische Inhibition des RHAMM-Liganden HA sensitivierte beide Zelllinien gegenüber ionisierender Bestrahlung. Weitere Mechanismen, die in der Strahlenantwort eine Rolle spielen, sind Tumorstroma-Interaktionen. Kokulturen aus Fibroblasten und bestrahlten Ösophaguskarzinom-Zellen (ESCC) zeigten eine Induktion der Apoptose in den Tumorzellen. Untersuchungen mit konditioniertem Medium ergaben, dass diese Zunahme im Falle unbestrahlter Fibroblasten durch sezernierte Faktoren hervorgerufen wird. Bestrahlte Fibroblasten hingegen bewirkten durch direkten Zell-Zell-Kontakt eine Verstärkung der Tumorzellapoptose. Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) führten dabei zu einer Reduktion von *HAS2* in Fibroblasten, welche möglicherweise zu einer Bildung von Membranbrücken, den *tunneling nanotubes* (TNT), beiträgt. Der ESCC-Zelltod konnte durch die pharmakologische Inhibition der TNT-Bildung mittels Cytochalasin B verhindert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bildung von TNT den Transfer von stromalen Mitochondrien begünstigt und dadurch möglicherweise p53-abhängiges Tumorzellsterben hervorruft. Zusammenfassend scheint die Modulation des HA-System somit einen vielversprechenden Ansatz für eine Verbesserung des Ansprechens auf die Strahlentherapie zu bieten.

9. Literaturverzeichnis

- Abdelrazzak, Abdelrazek B, Mark A Hill, Old Road, & Roosevelt Drive. 2011. "Intercellular Induction of Apoptosis Signalling Pathways." *Radiation Protection Dosimetry* 143 (2-4): 289–93. doi:10.1093/rpd/ncq387.
- Ady, Justin W, Snider Desir, Venugopal Thayanithy, Rachel I Vogel, André L Moreira, Robert J Downey, Yuman Fong, Katia Manova-Todorova, Malcolm A S Moore, & Emil Lou. 2014. "Intercellular Communication in Malignant Pleural Mesothelioma: Properties of Tunneling Nanotubes." *Frontiers in Physiology* 5 (October): 400. doi:10.3389/fphys.2014.00400.
- Ahmad, T, S Mukherjee, B Pattnaik, M Kumar, S Singh, M Kumar, R Rehman, *et al.* 2014. "Miro1 Regulates Intercellular Mitochondrial Transport & Enhances Mesenchymal Stem Cell Rescue Efficacy." *Embo J* 33 (9): 994–1010. doi:10.1002/embj.201386030.
- Allisy-Roberts, P J. 2005. "Radiation Quantities and Units – Understanding the Sievert." *Journal of Radiological Protection* 25 (1): 97–100. doi:10.1088/0952-4746/25/1/008.
- Andarawewa, Kumari L, Jenny Paupert, Anupama Pal, & Mary Helen Barcellos-Hoff. 2007. "New Rationales for Using TGFbeta Inhibitors in Radiotherapy." *International Journal of Radiation Biology* 83 (11-12): 803–11. doi:10.1080/09553000701711063.
- Assmann, V, C E Gillett, R Poulsom, K Ryder, I R Hart, & A M Hanby. 2001. "The Pattern of Expression of the Microtubule-Binding Protein RHAMM/IHABP in Mammary Carcinoma Suggests a Role in the Invasive Behaviour of Tumour Cells." *The Journal of Pathology* 195 (2): 191–96. doi:10.1002/path.941.
- Assmann, V, J F Marshall, C Fieber, M Hofmann, & I R Hart. 1998. "The Human Hyaluronan Receptor RHAMM Is Expressed as an Intracellular Protein in Breast Cancer Cells." *Journal of Cell Science* 111: 1685–94.
- Augustin, Florian, Michael Fiegl, Thomas Schmid, Geoffrey Pomme, William Sterlacci, & Alexandar Tzankov. 2015. "Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility (RHAMM, CD168) Expression Is Prognostically Important in Both Nodal Negative and Nodal Positive Large Cell Lung Cancer." *Journal of Clinical Pathology* 68 (5): 368–73. doi:10.1136/jclinpath-2014-202819.
- Austefjord, Magnus Wiger, Hans-Hermann Gerdes, & Xiang Wang. 2014. "Tunneling Nanotubes." *Communicative & Integrative Biology* 7 (1): e27934. doi:10.4161/cib.27934.
- Auvinen, P, R Tammi, J Parkkinen, M Tammi, U Agren, R Johansson, P Hirvikoski, M Eskelinen, & V M Kosma. 2000. "Hyaluronan in Peritumoral Stroma and Malignant Cells Associates with Breast Cancer Spreading and Predicts Survival." *The American Journal of Pathology* 156 (2): 529–36. doi:10.1016/S0002-9440(10)64757-8.
- Auvinen, Päivi, Kirsi Rilla, Ritva Tumelius, Markku Tammi, Reijo Sironen, Ylermi Soini, Veli-Matti Kosma, Arto Mannermaa, Jukka Viikari, and Raija Tammi. 2014. "Hyaluronan Synthases (HAS1-3) in Stromal and Malignant Cells Correlate with Breast Cancer Grade and Predict Patient Survival." *Breast Cancer Research and Treatment* 143 (2): 277–86. doi:10.1007/s10549-013-2804-7.
- Azzam, E I, S M de Toledo, and J B Little. 2001. "Direct Evidence for the Participation of Gap Junction-Mediated Intercellular Communication in the Transmission of Damage Signals from Alpha -Particle Irradiated to Nonirradiated Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2): 473–78. doi:10.1073/pnas.98.2.473.
- Bai, Yu-Pan, Kun Shang, Huan Chen, Fei Ding, Zhen Wang, Chen Liang, Ye Xu, Meng-Hong Sun, and Ying-Yi Li. 2015. "FGF-1/-3/FGFR4 Signaling in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Colon Cancer through Erk and MMP-7." *Cancer Science*, 1278–1287. doi:10.1111/cas.12745.
- Banerji, Suneale, Jian Ni, Shu Xia Wang, Steven Clasper, Jeffrey Su, Raija Tammi, Margaret Jones, & David G. Jackson. 1999. "LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-Specific Receptor for Hyaluronan." *Journal of Cell Biology* 144 (4): 789–801. doi:10.1083/jcb.144.4.789.
- Barak, Y, T Juven, R Haffner, & M Oren. 1993. "Mdm2 Expression Is Induced By Wild Type P53 Activity." *The EMBO Journal* 12 (2): 461–68.
- Barcellos-Hoff, Mary Helen, Catherine Park, & Eric G. Wright. 2005. "Radiation and the Microenvironment – Tumorigenesis and Therapy." *Nature Reviews Cancer* 5 (11): 867–75. doi:10.1038/nrc1735.
- Barker, Holly E, James T E Paget, Aadil A Khan, & Kevin J Harrington. 2015. "The Tumour Microenvironment after Radiotherapy: Mechanisms of Resistance and Recurrence." *Nature Reviews. Cancer* 15 (7). England: 409–25. doi:10.1038/nrc3958.

- Belcheva, I, T Stoychev, K Karadjov, & D Danchev. 1979. "Neuropharmacological Activity of Newly-Synthetized Derivatives of 3,3-Diethyl-2,4-Pyridinedione. III. N-Acyl Derivatives of 3,3-Diethyl-2,4-Pyridinedione." *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica* 5 (3): 75–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/539450>.
- Bernier, Jacques, Eric J Hall, & Amato Giaccia. 2004. "Radiation Oncology: A Century of Achievements." *Nature Reviews. Cancer* 4 (9): 737–47. doi:10.1038/nrc1451.
- Bhat, Krishna P L, Veerakumar Balasubramanian, Brian Vaillant, Karlijn Hummelink, Faith Hollingsworth, Khalida Wani, Johanna D James, *et al.* 2013. "Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- κ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma." *Cancer Cell* 24 (3): 331–46. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.001.Mesenchymal.
- Bhatia, Payal, Mirco Menigatti, Michele Brocard, Simon J Morley, & Stefano Ferrari. 2010. "Mitotic DNA Damage Targets the Aurora A/TPX2 Complex." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (22). United States: 4592–99.
- Bièche, Ivan, Sengül Tozlu, Igor Girault, & Rosette Lidereau. 2004. "Identification of a Three-Gene Expression Signature of Poor-Prognosis Breast Carcinoma." *Molecular Cancer* 3 (1): 37. doi:10.1186/1476-4598-3-37.
- Bissell, Mina J, & William C Hines. 2011. "Why Don't We Get More Cancer? A Proposed Role of the Microenvironment in Restraining Cancer Progression." *Nature Medicine* 17 (3). Nature Publishing Group: 320–29. doi:10.1038/nm.2328.
- Bonnans, C, J Chou, & Z Werb. 2014. "Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15 (12): 786–801. doi:10.1038/nrm3904.Remodelling.
- Bono, P, K Rubin, J M Higgins, & R O Hynes. 2001. "Layilin, a Novel Integral Membrane Protein, Is a Hyaluronan Receptor." *Molecular Biology of the Cell* 12 (4): 891–900. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=32274&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Borowicz, Stanley, Michelle Van Scoyk, Sreedevi Avasarala, Manoj Kumar Karuppusamy Rathinam, Jordi Tauler, Rama Kamesh Bikkavilli, & Robert A Winn. 2014. "The Soft Agar Colony Formation Assay," no. 92. JoVE: e51998. doi:doi:10.3791/51998.
- Brigelius-Flohe, Regina, & Matilde Maiorino. 2013. "Glutathione Peroxidases." *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5). Netherlands: 3289–3303. doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- Brosh, Ran, & Varda Rotter. 2009. "When Mutants Gain New Powers: News from the Mutant p53 Field." *Nature Reviews. Cancer* 9 (10). Nature Publishing Group: 701–13. doi:10.1038/nrc2693.
- Brozmanová, Jela, Dominika Mániková, Viera Vlčková, & Miroslav Chovanec. 2010. "Selenium: A Double-Edged Sword for Defense and Offence in Cancer." *Archives of Toxicology* 84 (12): 919–38. doi:10.1007/s00204-010-0595-8.
- Bukoreshtliev, Nickolay V., Xiang Wang, Erlend Hodneland, Steffen Gurke, João F.V. Barroso, & Hans-Hermann Gerdes. 2009. "Selective Block of Tunneling Nanotube (TNT) Formation Inhibits Intercellular Organelle Transfer between PC12 Cells." *FEBS Letters* 583 (9). Federation of European Biochemical Societies: 1481–88. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.065.
- Bullard, Kelli M, Hyeong-Rok Kim, Marie a Wheeler, Christopher M Wilson, Cheryl L Neudauer, Melanie a Simpson, & James B McCarthy. 2003. "Hyaluronan Synthase-3 Is Upregulated in Metastatic Colon Carcinoma Cells and Manipulation of Expression Alters Matrix Retention and Cellular Growth." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 107 (5): 739–46. doi:10.1002/ijc.11475.
- Busca, Aurelia, Mansi Saxena, Salma Iqbal, Jonathan Angel, & Ashok Kumar. 2014. "PI3K/Akt Regulates Survival during Differentiation of Human Macrophages by Maintaining NF- κ B-Dependent Expression of Antiapoptotic Bcl-xL." *Journal of Leukocyte Biology* 96 (December): 1–12. doi:10.1189/jlb.1A0414-212R.
- Camphausen, Kevin, Marsha A. Moses, Cynthia Ménard, Mary Sproull, Wolf Dietrich Beecken, Judah Folkman, & Michael S. O'Reilly. 2003. "Radiation Abscopal Antitumor Effect Is Mediated through p53." *Cancer Research* 63 (8): 1990–93. doi:10.1016/S0360-3016(02)03449-1.
- Chang, L, P H Graham, J Hao, J Ni, J Bucci, P J Cozzi, J H Kearsley, & Y Li. 2014. "PI3K/Akt/mTOR Pathway Inhibitors Enhance Radiosensitivity in Radioresistant Prostate Cancer Cells through Inducing Apoptosis, Reducing Autophagy, Suppressing NHEJ and HR Repair Pathways." *Cell Death and Disease* 5 (10): e1437. doi:10.1038/cddis.2014.415.
- Chargari, Cyrus, Céline Clemenson, Isabelle Martins, Jean-Luc Perfettini, and Eric Deutsch. 2013. "Understanding the Functions of Tumor Stroma in Resistance to Ionizing Radiation: Emerging Targets for Pharmacological Modulation." *Drug Resistance Updates* 16 (1-2). Elsevier Ltd: 10–21. doi:10.1016/j.drug.2013.01.001.

- Chen, C, M-C Chang, R-K Hsieh, Y-F Chang, J Lin, & K-W Tsan. 2005. "Activation of CD44 Facilitates DNA Repair in T-Cell Lymphoma but Has Differential Effects on Apoptosis Induced by Chemotherapeutic Agents and Ionizing Radiation." *Leukemia & Lymphoma* 46 (12): 1785–95. doi:10.1080/10428190500232501.
- Chen, Helen, Pooja Mohan, Jihong Jiang, Oksana Nemirovsky, Daniel He, Markus C. Fleisch, Dieter Niederacher, Linda M. Pilarski, C. James Lim, & Christopher a. Maxwell. 2014. "Spatial Regulation of Aurora A Activity during Mitotic Spindle Assembly Requires RHAMM to Correctly Localize TPX2." *Cell Cycle* 13 (14): 2248–61. doi:10.4161/cc.29270.
- Cheng, Xiao-Bo, Norihiro Sato, Shiro Kohi, Atsuhiko Koga, & Keiji Hirata. 2015. "Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility Is Associated with Poor Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Journal of Cancer* 6 (11): 1093–98. doi:10.7150/jca.12990.
- Cheung, W.-F., T. F. Cruz, & Eva A. Turley. 1999. "Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM), a Hyaladherin That Regulates Cell Responses to Growth Factors." *Biochemical Society Transactions* 27 (1961): 135–42.
- Chiarugi, V, L Magnelli, & M Cinelli. 1998. "Role of p53 Mutations in the Radiosensitivity Status of Tumor Cells." *Tumori* 84 (5): 517–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862508>.
- Chiba, I, T Takahashi, M M Nau, D D'Amico, D T Curiel, T Mitsudomi, D L Buchhagen, D Carbone, S Piantadosi, & H Koga. 1990. "Mutations in the p53 Gene Are Frequent in Primary, Resected Non-Small Cell Lung Cancer. Lung Cancer Study Group." *Oncogene* 5 (10): 1603–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1979160>.
- Chin, K V, K Ueda, I Pastan, & M M Gottesman. 1992. "Modulation of Activity of the Promoter of the Human MDR1 Gene by Ras and p53." *Science (New York, N.Y.)* 255 (December): 459–62. doi:10.1126/science.1346476.
- Cho, Y, S Gorina, P D Jeffrey, & N P Pavletich. 1994. "Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations." *Science (New York, N.Y.)* 265 (5170): 346–55. doi:10.1126/science.8023157.
- Chowdhury, I, W E Thompson, & K Thomas. 2014. "Prohibitins Role in Cellular Survival Through Ras-Raf-MEK-Erk Pathway." *J Cell Physiol* 229 (8): 998–1004. doi:10.1002/jcp.24872.The.
- Cirri, Paolo, & Paola Chiarugi. 2012. "Cancer-Associated-Fibroblasts and Tumour Cells: A Diabolic Liaison Driving Cancer Progression." *Cancer and Metastasis Reviews* 31 (1-2): 195–208. doi:10.1007/s10555-011-9340-x.
- Corre, Isabelle, Maëva Guillonneau, & François Paris. 2013. "Membrane Signaling Induced by High Doses of Ionizing Radiation in the Endothelial Compartment. Relevance in Radiation Toxicity." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (11): 22678–96. doi:10.3390/ijms141122678.
- Crainie, M, a R Belch, M J Mant, & L M Pilarski. 1999. "Overexpression of the Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM) Characterizes the Malignant Clone in Multiple Myeloma: Identification of Three Distinct RHAMM Variants." *Blood* 93 (5): 1684–96.
- Criscitello, Carmen, Angela Esposito, & Giuseppe Curigliano. 2014. "Tumor–stroma Crosstalk." *Current Opinion in Oncology* 26 (6): 551–55. doi:10.1097/CCO.0000000000000122.
- Crispo, Anna, Maria Grimaldi, Massimiliano D'Aiuto, Massimo Rinaldo, Immacolata Capasso, Alfonso Amore, Giuseppe D'Aiuto, Aldo Giudice, Gennaro Ciliberto, & Maurizio Montella. 2015. "BMI and Breast Cancer Prognosis Benefit: Mammography Screening Reveals Differences between Normal Weight and Overweight Women." *Breast (Edinburgh, Scotland)* 24 (1). Elsevier Ltd: 86–89. doi:10.1016/j.breast.2014.11.005.
- DeAngelis, Paul L. 2002. "Evolution of Glycosaminoglycans and Their Glycosyltransferases: Implications for the Extracellular Matrices of Animals and the Capsules of Pathogenic Bacteria." *The Anatomical Record* 268 (3): 317–26. doi:10.1002/ar.10163.
- Decaudin, Didier, Jozo Delic, Janine Dumont, Gérard Tertian, Emmanuel Blot, Bernard Dubray, Catherine Grandpeix, Régis Peffault de Latour, & Jean-Marc Cosset. 2002. "Clinical Efficacy of Irradiation in CLL Patients: Predictive Value of in Vitro Radio-Induced Apoptosis." *Leukemia & Lymphoma* 43 (4): 827–29. doi:10.1080/10428190290016962.
- Delaney, Geoff, Susannah Jacob, Carolyn Featherstone, & Michael Barton. 2005. "The Role of Radiotherapy in Cancer Treatment." *Cancer* 104 (6): 1129–37. doi:10.1002/cncr.21324.
- Deleyrolle, Loic P, Mark R Rohaus, Jeff M Fortin, Brent a Reynolds, & Hassan Azari. 2012. "Identification and Isolation of Slow-Dividing Cells in Human Glioblastoma Using Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 62: 3–7. doi:10.3791/3918.
- Desai, Sejal, Alisa Kobayashi, Teruaki Konishi, Masakazu Oikawa, & Badri N Pandey. 2014. "Damaging and Protective Bystander Cross-Talk between Human Lung Cancer and Normal Cells after Proton Microbeam Irradiation." *Mutation Research* 763-764. Netherlands: 39–44. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.03.004.

- Devarajan, Eswaran, Aysegul a Sahin, Jack S Chen, Raghu R Krishnamurthy, Neeraj Aggarwal, Anne-Marie Brun, Anna Sapino, *et al.* 2002. "Down-Regulation of Caspase 3 in Breast Cancer: A Possible Mechanism for Chemoresistance." *Oncogene* 21 (57): 8843–51. doi:10.1038/sj.onc.1206044.
- Dewhirst, Mark W., & Jen Tsan Chi. 2013. "Understanding the Tumor Microenvironment and Radioresistance by Combining Functional Imaging With Global Gene Expression." *Seminars in Radiation Oncology* 23 (4): 296–305. doi:10.1016/j.semradonc.2013.05.004.
- Diehn, Maximilian, Robert W Cho, Neethan A Lobo, Tomer Kalisky, Mary Jo, Angela N Kulp, Dalong Qian, *et al.* 2009. "Association of Reactive Oxygen Species Levels and Radioresistance in Cancer Stem Cells." *Nature* 458 (7239): 780–83. doi:10.1038/nature07733.Association.
- Du, Y.-C. N., C.-K. Chou, D. S. Klimstra, & H. Varmus. 2011. "Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility Isoform B Promotes Liver Metastasis in a Mouse Model of Multistep Tumorigenesis and a Tail Vein Assay for Metastasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (40): 16753–58. doi:10.1073/pnas.1114022108.
- Dwight, Zachary, Robert Palais, & Carl T. Wittwer. 2011. "uMELT: Prediction of High-Resolution Melting Curves and Dynamic Melting Profiles of PCR Products in a Rich Web Application." *Bioinformatics* 27 (7): 1019–20. doi:10.1093/bioinformatics/btr065.
- Edward, M., C. Gillan, D. Micha, & R. H. Tammi. 2005. "Tumour Regulation of Fibroblast Hyaluronan Expression: A Mechanism to Facilitate Tumour Growth and Invasion." *Carcinogenesis* 26 (7): 1215–23. doi:10.1093/carcin/bgi064.
- Erez, Neta, Morgan Truitt, Peter Olson, & Douglas Hanahan. 2010. "Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner." *Cancer Cell* 17 (2). Elsevier Ltd: 135–47. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.041.
- Eriksson, David, Per Olov Löfroth, Lennart Johansson, Katrine Åhlström Riklund, & Torgny Stigbrand. 2007. "Cell Cycle Disturbances and Mitotic Catastrophes in HeLa Hep2 Cells Following 2.5 to 10 Gy of Ionizing Radiation." *Clinical Cancer Research* 13 (18): 5501–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0980.
- Eriksson, David, & Torgny Stigbrand. 2010. "Radiation-Induced Cell Death Mechanisms." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 31 (4): 363–72. doi:10.1007/s13277-010-0042-8.
- Eschrich, Steven a., Jimmy Pramana, Hongling Zhang, Haiyan Zhao, David Boulware, Ji Hyun Lee, Gregory Bloom, *et al.* 2009. "A Gene Expression Model of Intrinsic Tumor Radiosensitivity: Prediction of Response and Prognosis After Chemoradiation." *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 75 (2): 489–96. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.06.014.
- Fichter, Christiane D, Corinna Herz, Claudia Münch, Oliver G Opitz, Martin Werner, & Silke Lassmann. 2011. "Occurrence of Multipolar Mitoses and Association with Aurora-A/-B Kinases and p53 Mutations in Aneuploid Esophageal Carcinoma Cells." *BMC Cell Biology* 12 (1). BioMed Central Ltd: 13. doi:10.1186/1471-2121-12-13.
- Fowler, J F. 2001. "Biological Factors Influencing Optimum Fractionation in Radiation Therapy." *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 40 (6). Norway: 712–17.
- Fuchs, Yaron, & Hermann Steller. 2015. "Live to Die Another Way: Modes of Programmed Cell Death and the Signals Emanating from Dying Cells." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (6). Nature Publishing Group: 329–44. doi:10.1038/nrm3999.
- Gan, G. N., J. Eagles, S. B. Keysar, G. Wang, M. J. Glogowska, C. Altunbas, R. T. Anderson, *et al.* 2014. "Hedgehog Signaling Drives Radioresistance and Stroma-Driven Tumor Repopulation in Head and Neck Squamous Cancers." *Cancer Research* 74 (23): 7024–36. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1346.
- Gerdes, Hans-Hermann, Amin Rustom, & Xiang Wang. 2013. "Tunneling Nanotubes, an Emerging Intercellular Communication Route in Development." *Mechanisms of Development* 130 (6-8). Elsevier Ireland Ltd: 381–87. doi:10.1016/j.mod.2012.11.006.
- Gertz, Em. 2005. "BLAST Scoring Parameters." <ftp://ftp.cbi.pku.edu.cn/pub/software/blast/documents/developer/scoring.pdf>, 1–54. https://wiki.ices.utexas.edu/clsb/export/1990/branches/loopp_dyndb/data/T_local/blastdb/linux/blast-2.2.18/doc/scoring.pdf.
- Giannopoulos, K, a Dmoszynska, M Kowal, J Rolinski, E Gostick, D a Price, J Greiner, *et al.* 2010. "Peptide Vaccination Elicits Leukemia-Associated Antigen-Specific Cytotoxic CD8+ T-Cell Responses in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia." *Leukemia* 24 (4): 798–805. doi:10.1038/leu.2010.29.

- Gillissen, B, a Richter, T Overkamp, F Essmann, P G Hemmati, R Preissner, C Belka, & P T Daniel. 2013. "Targeted Therapy of the XIAP/proteasome Pathway Overcomes TRAIL-Resistance in Carcinoma by Switching Apoptosis Signaling to a Bax/Bak-Independent 'Type I' Mode." *Cell Death & Disease* 4 (5). Nature Publishing Group: e643. doi:10.1038/cddis.2013.67.
- Godar, Samuel, Tan A Ince, George W Bell, David Feldser, Joana Liu Donaher, Jonas Bergh, Anne Liu, *et al.* 2008. "Growth-Inhibitory and Tumor- Suppressive Functions of p53 Depend on Its Repression of CD44 Expression." *Cell* 134 (1): 62–73. doi:10.1016/j.cell.2008.06.006.
- Graves, M V, D E Burbank, R Roth, J Heuser, P L DeAngelis, & J L Van Etten. 1999. "Hyaluronan Synthesis in Virus PBCV-1-Infected Chlorella-like Green Algae." *Virology* 257 (1): 15–23. doi:10.1006/viro.1999.9628.
- Greiner, Jochen, Anita Schmitt, Krzysztof Giannopoulos, Markus T. Rojewski, Marlies Götz, Isabel Funk, Mark Ringhoffer, *et al.* 2010. "High-Dose RHAMM-R3 Peptide Vaccination for Patients with Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndrome and Multiple Myeloma." *Haematologica* 95 (7): 1191–97. doi:10.3324/haematol.2009.014704.
- Gurke, Steffen, João F. V. Barroso, & Hans-Hermann Gerdes. 2008. "The Art of Cellular Communication: Tunneling Nanotubes Bridge the Divide." *Histochemistry and Cell Biology* 129 (5): 539–50. doi:10.1007/s00418-008-0412-0.
- Gust, Kilian M, Matthias D Hofer, Sven R Perner, Robert Kim, Arul M Chinnaiyan, Sooryanarayana Varambally, Peter Moller, *et al.* 2009. "RHAMM (CD168) Is Overexpressed at the Protein Level and May Constitute an Immunogenic Antigen in Advanced Prostate Cancer Disease." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (9). Canada: 956–63.
- Gwynne, S., B. P L Wijnhoven, M. Hulshof, & a. Bateman. 2014. "Role of Chemoradiotherapy in Oesophageal Cancer - Adjuvant and Neoadjuvant Therapy." *Clinical Oncology* 26 (9). Elsevier Ltd: 522–32. doi:10.1016/j.clon.2014.05.015.
- Hall, C L, B Yang, X Yang, S Zhang, M Turley, S Samuel, L a Lange, *et al.* 1995. "Overexpression of the Hyaluronan Receptor RHAMM Is Transforming and Is Also Required for H-Ras Transformation." *Cell* 82 (1): 19–26. doi:10.1016/0092-8674(95)90048-9.
- Hamilton, Sara R, Shireen F Fard, Frouz F Paiwand, Cornelia Tolg, Mandana Veisesh, Chao Wang, James B McCarthy, Mina J Bissell, James Koropatnick, & Eva A Turley. 2007. "The Hyaluronan Receptors CD44 and Rhamm (CD168) Form Complexes with ERK1,2 That Sustain High Basal Motility in Breast Cancer Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (22): 16667–80. doi:10.1074/jbc.M702078200.
- Hanahan, Douglas, & Lisa M. Coussens. 2012. "Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment." *Cancer Cell* 21 (3). Elsevier Inc.: 309–22. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.
- Hardwick, C, K Hoare, R Owens, H P Hohn, M Hook, D Moore, V Cripps, L Austen, D M Nance, & E a Turley. 1992. "Molecular Cloning of a Novel Hyaluronan Receptor That Mediates Tumor Cell Motility." *The Journal of Cell Biology* 117 (6): 1343–50.
- Hatano, Hiroko, Ikuko Ogawa, Hideo Shigeishi, Yasusei Kudo, Kouji Ohta, Koichiro Higashikawa, Masaaki Takechi, Takashi Takata, & Nobuyuki Kamata. 2013. "Expression of Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM) in Ossifying Fibromas." *Histology and Histopathology* 28 (4). Spain: 473–80.
- Hatano, Hiroko, Hideo Shigeishi, Yasusei Kudo, Koichiro Higashikawa, Kei Tobiume, Takashi Takata, & Nobuyuki Kamata. 2011. "RHAMM/ERK Interaction Induces Proliferative Activities of Cementifying Fibroma Cells through a Mechanism Based on the CD44-EGFR." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 91 (3). Nature Publishing Group: 379–91. doi:10.1038/labinvest.2010.176.
- Hein, Ashley L, Michel M Ouellette, & Ying Yan. 2014. "Radiation-Induced Signaling Pathways That Promote Cancer Cell Survival (review)." *International Journal of Oncology* 45 (5): 1813–19. doi:10.3892/ijo.2014.2614.
- Hellevik, Turid, Ingvald Pettersen, Vivian Berg, Jack Bruun, Kristian Bartnes, Lill-Tove Busund, Anthony Chalmers, Roy Bremnes, & Iñigo Martinez-Zubiaurre. 2013. "Changes in the Secretory Profile of NSCLC-Associated Fibroblasts after Ablative Radiotherapy: Potential Impact on Angiogenesis and Tumor Growth." *Translational Oncology* 6 (1): 66–74. doi:10.1593/tlo.12349.
- Helton, E. Scott, & Xinbin Chen. 2007. "p53 Modulation of the DNA Damage Response." *Journal of Cellular Biochemistry* 100: 883–96. doi:10.1002/jcb.21091.

- Hinds, P W, C a Finlay, R S Quartin, S J Baker, E R Fearon, B Vogelstein, & a J Levine. 1990. "Mutant p53 DNA Clones from Human Colon Carcinomas Cooperate with Ras in Transforming Primary Rat Cells: A Comparison of the 'Hot Spot' Mutant Phenotypes." *Cell Growth & Differentiation : The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 1 (12): 571–80.
- Hinz, B, P Pittet, J Smith-Clerc, C Chaponnier, & J-J Meister. 2004. "Myofibroblast Development Is Characterized by Specific Cell-Cell Adherens Junctions." *Molecular Biology of the Cell* 15: 4310–20. doi:10.1091/mbc.E04.
- Hiraga, Toru, Susumu Ito, & Hiroaki Nakamura. 2013. "Cancer Stem-like Cell Marker CD44 Promotes Bone Metastases by Enhancing Tumorigenicity, Cell Motility, and Hyaluronan Production." *Cancer Research* 73 (13): 4112–22. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3801.
- Hoffman, A., L.M. Spetner, & M. Burke. 2008. "Ramifications of a Redox Switch within a Normal Cell: Its Absence in a Cancer Cell." *Free Radical Biology and Medicine* 45 (3): 265–68. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.025.
- Hoffman, William H., Siham Biade, Jack T. Zilfou, Jiandong Chen, & Maureen Murphy. 2002. "Transcriptional Repression of the Anti-Apoptotic Survivin Gene by Wild Type p53." *Journal of Biological Chemistry* 277 (5): 3247–57. doi:10.1074/jbc.M106643200.
- Hollstein, Monica, David Sidransky, Bert Vogelstein, & C C Harris. 1991. "P53 Mutations in Human Cancers." *Science (New York, N.Y.)* 253 (July): 49–53. doi:10.1126/science.1905840.
- Hooning, Maartje J, Akke Botma, Berthe M P Aleman, Margreet H A Baaijens, Harry Bartelink, Jan G M Klijn, Carolyn W Taylor, & Flora E van Leeuwen. 2007. "Long-Term Risk of Cardiovascular Disease in 10-Year Survivors of Breast Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 99 (5): 365–75. doi:10.1093/jnci/djk064.
- Huang, Jing, Shaoning Yu, Chaoneng Ji, & Jixi Li. 2015. "Structural Basis of Cell Apoptosis and Necrosis in TNFR Signaling." *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death* 20 (2). Netherlands: 210–15. doi:10.1007/s10495-014-1061-5.
- Hui, L, Y Zheng, Y Yan, J Bargonetti, & D a Foster. 2006. "Mutant p53 in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Is Stabilized by Elevated Phospholipase D Activity and Contributes to Survival Signals Generated by Phospholipase D." *Oncogene* 25 (55): 7305–10. doi:10.1038/sj.onc.1209735.
- Hwang¹, Rosa F., Todd T. Moore, Maureen Mertens Hattersley, Meghan Scarpitti, Bin Yang, Erik Devereaux, Viji Ramachandran, *et al.* 2012. "Inhibition of the Hedgehog Pathway Targets the Tumor-Associated Stroma in Pancreatic Cancer." *Mol Cancer Res* 10 (9): 1147–57. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0022.INHIBITION.
- Hynes, Richard O. 2009. "Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils." *Science* 326 (5957): 1216–19. doi:10.1126/science.1176009.Extracellular.
- Ishigami, Sumiya, Shinichi Ueno, Yuka Nishizono, Masataka Matsumoto, Hiroshi Kurahara, Takaaki Arigami, Yasuto Uchikado, *et al.* 2011. "Prognostic Impact of CD168 Expression in Gastric Cancer." *BMC Cancer* 11 (1). BioMed Central Ltd: 106. doi:10.1186/1471-2407-11-106.
- Itano, Naoki, & Koji Kimata. 2002. "Mammalian Hyaluronan Synthases." *IUBMB Life* 1 (4): 195–99. doi:10.1080/15216540290114478.
- Ivanov, Vladimir N., Hongning Zhou, Shanaz a. Ghandhi, Thomas B. Karasic, Benjamin Yaghoubian, Sally a. Amundson, & Tom K. Hei. 2010. "Radiation-Induced Bystander Signaling Pathways in Human Fibroblasts: A Role for Interleukin-33 in the Signal Transmission." *Cellular Signalling* 22 (7). Elsevier Inc.: 1076–87. doi:10.1016/j.cellsig.2010.02.010.
- Iyer, Rashi, & Brace E. Lehnert. 2000. "Factors Underlying the Cell Growth-Related Bystander Responses to α Particles." *Cancer Research* 60 (5): 1290–98.
- Jang, Chuan-Wei, Chun-Han Chen, Chun-Chieh Chen, Jia-yun Chen, Yi-Hsien Su, & Ruey-Hwa Chen. 2001. "TGF-Beta Induces Apoptosis through Smad-Mediated Expression of DAP-Kinase." *Nature Cell Biology* 4 (1): 51–58. doi:10.1038/ncb731.
- Jiang, Dianhua, Jiurong Liang, Juan Fan, Shuang Yu, Suping Chen, Yi Luo, Glenn D Prestwich, *et al.* 2005. "Regulation of Lung Injury and Repair by Toll-like Receptors and Hyaluronan." *Nature Medicine* 11 (11): 1173–79. doi:10.1038/nm1315.
- Jin, Zhaoyu, & Wafik S El-Deiry. 2005. "Overview of Cell Death Signaling Pathways." *Cancer Biology & Therapy* 4 (2). United States: 139–63.
- Jinka, Rajeswari, Renu Kapoor, Pavana Goury Sistla, T Avinash Raj, & Gopal Pande. 2012. "Alterations in Cell-Extracellular Matrix Interactions during Progression of Cancers." *International Journal of Cell Biology* 2012: 219196. doi:10.1155/2012/219196.

- Joukov, Vladimir, Aaron C. Groen, Tatyana Prokhorova, Ruth Gerson, Erinn White, Alison Rodriguez, Johannes C. Walter, & David M. Livingston. 2006. "The BRCA1/BARD1 Heterodimer Modulates Ran-Dependent Mitotic Spindle Assembly." *Cell* 127 (3): 539–52. doi:10.1016/j.cell.2006.08.053.
- Junttila, Melissa R, & Frederic J de Sauvage. 2013. "Influence of Tumour Micro-Environment Heterogeneity on Therapeutic Response." *Nature* 501 (7467). England: 346–54. doi:10.1038/nature12626.
- Kamochi, Noriyuki, Masahiro Nakashima, Shigehisa Aoki, Kazuyoshi Uchihashi, Hajime Sugihara, Shuji Toda, & Sho Kudo. 2008. "Irradiated Fibroblast-Induced Bystander Effects on Invasive Growth of Squamous Cell Carcinoma under Cancer-Stromal Cell Interaction." *Cancer Science* 99 (12): 2417–27. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00978.x.
- Kappler, Matthias, Helge Taubert, Frank Bartel, Karen Blumke, Matti Panian, Hannelore Schmidt, Jurgen Dunst, & Matthias Bache. 2005. "Radiosensitization, after a Combined Treatment of Survivin siRNA and Irradiation, Is Correlated with the Activation of Caspases 3 and 7 in a Wt-p53 Sarcoma Cell Line, but Not in a Mt-p53 Sarcoma Cell Line." *Oncology Reports* 13 (1). Greece: 167–72.
- Karpel-Massler, Georg, Maïmouna Bâ, Chang Shu, Marc-Eric Halatsch, Mike-Andrew Westhoff, Jeffrey N Bruce, Peter Canoll, & Markus D Siegelin. 2015. "TIC10/ONC201 Synergizes with Bcl-2/Bcl-xL Inhibition in Glioblastoma by Suppression of Mcl-1 and Its Binding Partners in Vitro and in Vivo." *Oncotarget* 6 (34). doi:10.18632/oncotarget.5505.
- Kato, Shunsuke, Shuang-Yin Han, Wen Liu, Kazunori Otsuka, Hiroyuki Shibata, Ryunosuke Kanamaru, & Chikashi Ishioka. 2003. "Understanding the Function-Structure and Function-Mutation Relationships of p53 Tumor Suppressor Protein by High-Resolution Missense Mutation Analysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8424–29. doi:10.1073/pnas.1431692100.
- Katz, David, Emma Ito, Ken S. Lau, Joseph D. Mocanu, Carlo Bastianutto, Aaron D. Schimmer, & Fei Fei Liu. 2008. "Increased Efficiency for Performing Colony Formation Assays in 96-Well Plates: Novel Applications to Combination Therapies and High-Throughput Screening." *BioTechniques* 44 (2): 9–14. doi:10.2144/000112757.
- Kerr, J F, A H Wyllie, & A R Currie. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26 (4): 239–57. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.
- Kho, Patricia S., Zhen Wang, Li Zhuang, Yuqing Li, Joon Lin Chew, Huck Hui Ng, Edison T. Liu, & Qiang Yu. 2004. "P53-Regulated Transcriptional Program Associated With Genotoxic Stress-Induced Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 279 (20): 21183–92. doi:10.1074/jbc.M311912200.
- Kim, Ella, & Wolfgang Deppert. 2004. "Transcriptional Activities of Mutant p53: When Mutations Are More than a Loss." *Journal of Cellular Biochemistry* 93 (5). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 878–86. doi:10.1002/jcb.20271.
- Kirshner, Jessica R, Suqin He, Vishwasenani Balasubramanyam, Jane Kepros, Chin-Yu Yang, Mei Zhang, Zhenjian Du, James Barsoum, & John Bertin. 2008. "Elesclomol Induces Cancer Cell Apoptosis through Oxidative Stress." *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (8): 2319–27. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0298.
- Kirshner, Julia, Michael F. Jobling, Maria Jose Pajares, Shraddha a. Ravani, Adam B. Glick, Martin J. Lavin, Sergei Koslov, Yosef Shiloh, & Mary Helen Barcellos-Hoff. 2006. "Inhibition of Transforming Growth Factor-beta1 Signaling Attenuates Ataxia Telangiectasia Mutated Activity in Response to Genotoxic Stress." *Cancer Research* 66 (22): 10861–69. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2565.
- Klammer, Holger, Emil Mladenov, Fanghua Li, & George Iliakis. 2015. "Bystander Effects as Manifestation of Intercellular Communication of DNA Damage and of the Cellular Oxidative Status." *Cancer Letters* 356 (1). Elsevier Ireland Ltd: 58–71. doi:10.1016/j.canlet.2013.12.017.
- Kobashigawa, Shinko, Genro Kashino, Keiji Suzuki, Shunichi Yamashita, & Hiromu Mori. 2015. "Ionizing Radiation-Induced Cell Death Is Partly Caused by Increase of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Normal Human Fibroblast Cells." *Radiation Research* 183 (4): 455–64. doi:10.1667/RR13772.1.
- Korkes, Fernando, Marília Germanos Castro, Stenio De Cassio Zequi, Livia Nardi, Auro L Giglio, & Antonio Carlos De Lima Peo. 2013. "RHAMM Immunohistochemical Expression and Androgen Deprivation in Normal Peritumoural, Hyperplastic and Neoplastic Prostate Tissue." *BJU International*, 822–29. doi:10.1111/bju.12339.

- Kretschmer, I, T Freudenberger, S Twarock, & J W Fischer. 2015. "Synergistic Effect of Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor and Hyaluronan Synthesis in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Cells." *British Journal of Pharmacology*, July. doi:10.1111/bph.13240.
- Kuerbitz, S J, B S Plunkett, W V Walsh, & M B Kastan. 1992. "Wild-Type p53 Is a Cell Cycle Checkpoint Determinant Following Irradiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (16): 7491–95. doi:10.1073/pnas.89.16.7491.
- Kuhlmann, Ulrike C, Caroline E Chwieralski, Dirk Reinhold, Tobias Welte, & Frank Buhling. 2009. "Radiation-Induced Matrix Production of Lung Fibroblasts Is Regulated by Interleukin-8." *International Journal of Radiation Biology* 85 (2): 138–43. doi:10.1080/09553000802641136.
- Kuroda, K, a Utani, Y Hamasaki, & H Shinkai. 2001. "Up-Regulation of Putative Hyaluronan Synthase mRNA by Basic Fibroblast Growth Factor and Insulin-like Growth Factor-1 in Human Skin Fibroblasts." *Journal of Dermatological Science* 26 (2): 156–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378333>.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259): 680–85. doi:10.1038/227680a0.
- Lai, Fang-Nong, Jun-Yu Ma, Jing-Cai Liu, Jun-Jie Wang, Shun-Feng Cheng, Xiao-Feng Sun, Lan Li, Bo Li, Charles Martin Nyachoti, & Wei Shen. 2015. "The Influence of N-Acetyl-L-Cysteine on Damage of Porcine Oocyte Exposed to Zearalenone in Vitro." *Toxicology and Applied Pharmacology*, September. doi:10.1016/j.taap.2015.09.010.
- Lalani, Nafisha, Lawrence Paszat, Rinku Sutradhar, Deva Thiruchelvam, Sharon Nofech-Mozes, Wedad Hanna, Elzbieta Slodkowska, *et al.* 2014. "Long-Term Outcomes of Hypofractionation versus Conventional Radiation Therapy after Breast-Conserving Surgery for Ductal Carcinoma in Situ of the Breast." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 90 (5). Elsevier Inc.: 1017–24. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.07.026.
- Lane, D P. 1992. "Cancer. p53, Guardian of the Genome." *Nature*. doi:10.1038/358015a0.
- Leach, J Kevin, Glenn Van Tuyle, Peck-sun Lin, Rupert Schmidt-ullrich, & Ross B Mikkelsen. 2001. "Ionizing Radiation-Induced , Mitochondria-Dependent Generation of Reactive Oxygen / Nitrogen 1," 3894–3901.
- Lee, J M, & a Bernstein. 1993. "P53 Mutations Increase Resistance To Ionizing Radiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (12): 5742–46. doi:10.1073/pnas.90.12.5742.
- Leu, S.-W., L. Shi, C. Xu, Y. Zhao, B. Liu, Y. Li, A. Shiedlin, *et al.* 2011. "TLR4 through IFN- Promotes Low Molecular Mass Hyaluronan-Induced Neutrophil Apoptosis." *The Journal of Immunology* 186 (1): 556–62. doi:10.4049/jimmunol.1001630.
- Levental, Kandice R., Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N. Lakins, Mikala Egeblad, Janine T. Erler, Sheri F.T. Fong, *et al.* 2009. "Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling." *Cell* 139 (5). Elsevier Ltd: 891–906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027.
- Li, Runzhao, Patrick D Sutphin, Dov Schwartz, Deborah Matas, Nava Almog, Roland Wolkowicz, Naomi Gold, Huiping Pei, Miron Prokocimer, & Varda Rotter. 1998. "Mutant p53 Protein Expression Interferes with p53-Independent Apoptotic Pathways." *Molecular Cell*.
- Li, Wen-Feng, Li Zhang, Hai-Ying Li, Si-Si Zheng, & Liang Zhao. 2014. "WISP-1 Contributes to Fractionated Irradiation-Induced Radioresistance in Esophageal Carcinoma Cell Lines and Mice." *PloS One* 9 (4): e94751. doi:10.1371/journal.pone.0094751.
- Li, Y, M Rahmanian, C Widström, G Lepperdinger, G I Frost, & P Heldin. 2000. "Irradiation-Induced Expression of Hyaluronan (HA) Synthase 2 and Hyaluronidase 2 Genes in Rat Lung Tissue Accompanies Active Turnover of HA and Induction of Types I and III Collagen Gene Expression." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 23 (3): 411–18. doi:10.1165/ajrcmb.23.3.4102.
- Liang, Jiurong, Dianhua Jiang, & Paul W Noble. 2015. "Hyaluronan as a Therapeutic Target in Human Diseases." *Advanced Drug Delivery Reviews*, November. doi:10.1016/j.addr.2015.10.017.
- Livak, K J, & T D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lockshin, Richard A., & Zahra Zakeri. 2004. "Apoptosis, Autophagy, and More." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (12): 2405–19. doi:10.1016/j.biocel.2004.04.011.
- Lokeshwar, Vinata B, Luis E Lopez, Daniel Munoz, Andrew Chi, Samir P Shirodkar, Soum D Lokeshwar, Diogo O Escudero, Neetika Dhir, & Norman Altman. 2010. "Antitumor Activity of Hyaluronic Acid Synthesis Inhibitor 4-Methylumbelliferone in Prostate Cancer Cells." *Cancer Research* 70 (7): 2613–23. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3185.

- Lou, Emil, Sho Fujisawa, Alexei Morozov, Afsar Barlas, Yevgeniy Romin, Yildirim Dogan, Sepideh Gholami, André L. Moreira, Katia Manova-Todorova, & Malcolm a. S. Moore. 2012. "Tunneling Nanotubes Provide a Unique Conduit for Intercellular Transfer of Cellular Contents in Human Malignant Pleural Mesothelioma." *PLoS ONE* 7 (3): e33093. doi:10.1371/journal.pone.0033093.
- Lu, X., J. Errington, N. J. Curtin, J. Lunec, & D. R. Newell. 2001. "The Impact of p53 Status on Cellular Sensitivity to Antifolate Drugs." *Clinical Cancer Research* 7 (7): 2114–23.
- Lu, Zhimin, & Shuichan Xu. 2006. "ERK1/2 MAP Kinases in Cell Survival and Apoptosis." *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* 58 (11): 621–31. doi:10.1080/15216540600957438.
- Luo, Cheng, Yan Li, Hui Wang, Zhihui Feng, Yuan Li, Jiangang Long, & Jiankang Liu. 2013. "Mitochondrial Accumulation under Oxidative Stress Is due to Defects in Autophagy." *Journal of Cellular Biochemistry* 114 (1): 212–19. doi:10.1002/jcb.24356.
- Lyng, F M, C B Seymour, & C Mothersill. 2002. "Initiation of Apoptosis in Cells Exposed to Medium from the Progeny of Irradiated Cells: A Possible Mechanism for Bystander-Induced Genomic Instability?" *Radiation Research* 157 (4): 365–70. doi:10.1667/0033-7587(2002)157[0365:IOAICE]2.0.CO;2.
- Lyng, Fiona M, Orla L Howe, & Brendan McClean. 2011. "Reactive Oxygen Species-Induced Release of Signalling Factors in Irradiated Cells Triggers Membrane Signalling and Calcium Influx in Bystander Cells." *International Journal of Radiation Biology* 87 (7): 683–95. doi:10.3109/09553002.2010.549533.
- Mack, Judith a, Ron J Feldman, Naoki Itano, Koji Kimata, Mark Lauer, Vincent C Hascall, & Edward V Maytin. 2012. "Enhanced Inflammation and Accelerated Wound Closure Following Tetraborborol Ester Application or Full-Thickness Wounding in Mice Lacking Hyaluronan Synthases Has1 and Has3." *The Journal of Investigative Dermatology* 132 (1). Nature Publishing Group: 198–207. doi:10.1038/jid.2011.248.
- Mantoni, Tine S, Serena Lunardi, Osama Al-Assar, Atsushi Masamune, & Thomas B Brunner. 2011. "Pancreatic Stellate Cells Radioprotect Pancreatic Cancer Cells through β 1-Integrin Signaling." *Cancer Research* 71 (10): 3453–58. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1633.
- Manzanares, Dahis, Maria-Elena Monzon, Rashmin C. Savani, & Matthias Salathe. 2007. "Apical Oxidative Hyaluronan Degradation Stimulates Airway Ciliary Beating via RHAMM and RON." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 37 (2): 160–68. doi:10.1165/rcmb.2006-0413OC.
- Mariotti, L G, A B Abdelrazzak, A Ottolenghi, P O Neill, & M A Hill. 2015. "Stimulation of Intercellular Induction of Apoptosis in Transformed Cells At Very Low Doses of Ionising Radiation : Spatial and Temporal Features." *Radiation Protection Dosimetry* 166 (1-4): 164–164.
- Marshall, Derek C., Susan K. Lyman, Scott McCauley, Maria Kovalenko, Rhyannon Spangler, Chian Liu, Michael Lee, *et al.* 2015. "Selective Allosteric Inhibition of MMP9 Is Efficacious in Preclinical Models of Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer." *Plos One* 10 (5): e0127063. doi:10.1371/journal.pone.0127063.
- Maxwell, Christopher A, Erik Rasmussen, Fenghuang Zhan, Jonathan J Keats, Sophia Adamia, Erin Strachan, Mary Crainie, *et al.* 2004. "RHAMM Expression and Isoform Balance Predict Aggressive Disease and Poor Survival in Multiple Myeloma." *Blood* 104 (4): 1151–58. doi:10.1182/blood-2003-11-4079.
- Maxwell, Christopher Alan, James McCarthy, & Eva Turley. 2008. "Cell-Surface and Mitotic-Spindle RHAMM: Moonlighting or Dual Oncogenic Functions?" *Journal of Cell Science* 121 (Pt 7): 925–32. doi:10.1242/jcs.022038.
- Maxwell, S A, & G E Davis. 2000. "Differential Gene Expression in p53-Mediated Apoptosis-Resistant vs. Apoptosis-Sensitive Tumor Cell Lines." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (24): 13009–14. doi:10.1073/pnas.230445997.
- McBain, C A, E A Young, R Swindell, B Magee, & A L Stewart. 2003. "Local Recurrence of Breast Cancer Following Surgery and Radiotherapy: Incidence and Outcome." *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 15 (1): 25–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12602551>.
- McCourt, P a, B Ek, N Forsberg, & S Gustafson. 1994. "Intercellular Adhesion Molecule-1 Is a Cell Surface Receptor for Hyaluronan." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (48): 30081–84.
- McGregor, Megan J, Wakkas Fadhil, Rose Wharton, Yoko Yanagisawa, Michael Presz, Alison Pritchard, Chris Womack, *et al.* 2015. "Aberrant P53 Expression Lacks Prognostic or Predictive Significance in Colorectal Cancer: Results from the VICTOR Trial." *Anticancer Research* 35 (3): 1641–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750322>.
- Meltzer, P S. 1994. "MDM2 and p53: A Question of Balance." *Journal of the National Cancer Institute* 86 (17): 1265–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8064885>.

- Mihara, Motohiro, Susan Erster, Alexander Zaika, Oleksi Petrenko, Thomas Chittenden, Petr Pancoska, & Ute M. Moll. 2003. "P53 Has a Direct Apoptogenic Role At the Mitochondria." *Molecular Cell* 11 (3): 577–90. doi:10.1016/S1097-2765(03)00050-9.
- Milner, J, & E a Medcalf. 1991. "Cotranslation of Activated Mutant p53 with Wild Type Drives the Wild-Type p53 Protein into the Mutant Conformation." *Cell* 65 (5): 765–74. doi:10.1016/0092-8674(91)90384-B.
- Mirza, Asra, Marnie McGuirk, Tish N Hockenberry, Qun Wu, Hena Ashar, Stuart Black, Shu Fen Wen, et al. 2002. "Human Survivin Is Negatively Regulated by Wild-Type p53 and Participates in p53-Dependent Apoptotic Pathway." *Oncogene* 21 (2002): 2613–22. doi:10.1038/sj.onc.1205353.
- Mohapatra, S, X Yang, J a Wright, E a Turley, & a H Greenberg. 1996. "Soluble Hyaluronan Receptor RHAMM Induces Mitotic Arrest by Suppressing Cdc2 and Cyclin B1 Expression." *The Journal of Experimental Medicine* 183 (4): 1663–68. doi:10.1084/jem.183.4.1663.
- Morales, T. I., & V. C. Hascall. 1988. "Correlated Metabolism of Proteoglycans and Hyaluronic Acid in Bovine Cartilage Organ Cultures." *Journal of Biological Chemistry* 263 (8): 3632–38.
- Mothersill, C, & C Seymour. 1997. "Medium from Irradiated Human Epithelial Cells but Not Human Fibroblasts Reduces the Clonogenic Survival of Unirradiated Cells." *International Journal of Radiation Biology* 71 (4). ENGLAND: 421–27.
- Muller, Patricia A J, & Karen H Vousden. 2014. "Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities." *Cancer Cell* 25 (3). Elsevier: 304–17. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.021.
- Muller, Patricia A. J., & Karen H. Vousden. 2013. "P53 Mutations in Cancer." *Nature Cell Biology* 15 (1). Nature Publishing Group: 2–8. doi:10.1038/ncb2641.
- Nagai, Masazumi, Nha H. Vo, Luisa Shin Ogawa, Dinesh Chimmanamada, Takayo Inoue, John Chu, Britte C. Beaudette-Zlatanova, et al. 2012. "The Oncology Drug Elesclomol Selectively Transports Copper to the Mitochondria to Induce Oxidative Stress in Cancer Cells." *Free Radical Biology and Medicine* 52 (10). Elsevier: 2142–50. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.017.
- Nedvetzki, Shlomo, Erez Gonen, Nathalie Assayag, Reuven Reich, Richard O Williams, Robin L Thurmond, Jing-Feng Huang, et al. 2004. "RHAMM, a Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility, Compensates for CD44 in Inflamed CD44-Knockout Mice: A Different Interpretation of Redundancy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (52): 18081–86. doi:10.1073/pnas.0407378102.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, & C. Riccardi. 1991. "A Rapid and Simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry." *Journal of Immunological Methods* 139 (2): 271–79. doi:10.1016/0022-1759(91)90198-O.
- Niedworok, Christian, Inga Kretschmer, Katharina Röck, Frank Vom Dorp, Tibor Szarvas, Jochen Heß, Till Freudenberger, Ariane Melchior-Becker, Herbert Rübben, & Jens W Fischer. 2013. "The Impact of the Receptor of Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM) on Human Urothelial Transitional Cell Cancer of the Bladder." *PloS One* 8 (9): e75681. doi:10.1371/journal.pone.0075681.
- Nikitovic, Katerina Kouvidi, Nikos K. Karamanos, & George N. Tzanakakis. 2013. "The Roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and Their Respective Interactions along the Insidious Pathways of Fibrosarcoma Progression." *BioMed Research International* 2013: 1–12. doi:10.1155/2013/929531.
- Ohuchida, K. 2004. "Radiation to Stromal Fibroblasts Increases Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells through Tumor-Stromal Interactions." *Cancer Research* 64 (9): 3215–22. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2464.
- Ohuchida, Kenoki, Kazuhiro Mizumoto, Mitsuhiko Murakami, Li-Wu Qian, Norihiro Sato, Eishi Nagai, Kunio Matsumoto, Toshikazu Nakamura, & Masao Tanaka. 2004. "Radiation to Stromal Fibroblasts Increases Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells through Tumor-Stromal Interactions." *Cancer Research* 64 (9): 3215–22. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2464.
- Okon, Imoh S., & Ming-Hui Zou. 2015. "Mitochondrial ROS and Cancer Drug Resistance: Implications for Therapy." *Pharmacological Research* 100. Elsevier Ltd: 170–74. doi:10.1016/j.phrs.2015.06.013.
- Olive, P L, & R E Durand. 1997. "Apoptosis: An Indicator of Radiosensitivity in Vitro?" *International Journal of Radiation Biology* 71 (6): 695–707. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9246184>.
- Olivier, Magali, Ros Eeles, Monica Hollstein, Mohammed A Khan, Curtis C Harris, & Pierre Hainaut. 2002. "The IARC TP53 Database: New Online Mutation Analysis and Recommendations to Users." *Human Mutation* 19 (6): 607–14. doi:10.1002/humu.10081.
- Olivier, Magali, Monica Hollstein, & Pierre Hainaut. 2010. "TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (1): 1–17. doi:10.1101/cshperspect.a001008.

- Omary, M Bishr, Aurelia Lugea, Anson W Lowe, & Stephen J Pandol. 2007. "The Pancreatic Stellate Cell: A Star on the Rise in Pancreatic Diseases." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (1): 50–59. doi:10.1172/JCI30082.
- Ozdemir, Berna C, Tsvetelina Pentcheva-Hoang, Julianne L Carstens, Xiaofeng Zheng, Chia-Chin Wu, Tyler R Simpson, Hanane Laklai, *et al.* 2014. "Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival." *Cancer Cell* 25 (6): 719–34. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005.
- Palmer, W, & J K Meyer. 1934. "Polysaccharide of Vitreous Humor." *J Biol Chem*, 629–34.
- Papadopolou, Adamantia, & Dimitris Kletsas. 2011. "Human Lung Fibroblasts Prematurely Senescent after Exposure to Ionizing Radiation Enhance the Growth of Malignant Lung Epithelial Cells in Vitro and in Vivo." *International Journal of Oncology* 39: 989–99. doi:10.3892/ijo.2011.1132.
- Park, Deokbum, Youngmi Kim, Hyunah Kim, Kyungjong Kim, Yun-Sil Lee, Jongseon Choe, Jang-Hee Hahn, *et al.* 2012. "Hyaluronic Acid Promotes Angiogenesis by Inducing RHAMM-TGFβ Receptor Interaction via CD44-PKCδ." *Molecules and Cells* 33 (6): 563–74. doi:10.1007/s10059-012-2294-1.
- Pasquier, Jennifer, Bella S Guerrouahen, Hamda Al Thawadi, Pegah Ghiabi, Mahtab Maleki, Nadine Abu-Kaoud, Arthur Jacob, *et al.* 2013. "Preferential Transfer of Mitochondria from Endothelial to Cancer Cells through Tunneling Nanotubes Modulates Chemoresistance." *Journal of Translational Medicine* 11 (1). Journal of Translational Medicine: 94. doi:10.1186/1479-5876-11-94.
- Paunescu, Virgil, Florina M. Bojin, Calin a. Tatu, Oana I. Gavriluc, Adriana Rosca, Alexandra T. Gruia, Gabriela Tanasie, *et al.* 2011. "Tumour-Associated Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells: More Similarities than Differences." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15 (3): 635–46. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01044.x.
- Perfettini, Jean-Luc, Maria Castedo, Roberta Nardacci, Fabiola Ciccocanti, Patricia Boya, Thomas Roumier, Nathanael Larochette, Mauro Piacentini, & Guido Kroemer. 2005. "Essential Role of p53 Phosphorylation by p38 MAPK in Apoptosis Induction by the HIV-1 Envelope." *The Journal of Experimental Medicine* 201 (2): 279–89. doi:10.1084/jem.20041502.
- Perrier, G, P Teniere, Y Graoc, M Scotte, I Leblanc-Louvry, & F Michot. 1998. "Squamous Cell Carcinoma of the Thoracic Esophagus Following Radiation Therapy for Breast Cancer." *Hepato-Gastroenterology* 45 (24). GREECE: 2197–2201.
- Peshavariya, Hitesh M., Gregory James Disting, & Stavros Selemidis. 2007. "Analysis of Dihydroethidium Fluorescence for the Detection of Intracellular and Extracellular Superoxide Produced by NADPH Oxidase." *Free Radical Research* 41 (6): 699–712. doi:10.1080/10715760701297354.
- Phillips, T. M., W. H. McBride, & F. Pajonk. 2006. "The Response of CD24-low/CD44+ Breast Cancer-Initiating Cells to Radiation." *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 98 (24): 1777–85. doi:10.1093/jnci/djj495.
- Ponta, Helmut, Larry Sherman, & Peter A Herrlich. 2003. "CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (1). Nature Publishing Group: 33–45. doi:10.1038/nrm1004.
- Porschen, R. 2015. "Magenkarzinom „ Diagnostik Und Therapie Der Adenokarzinome Des Magens Und Oesophagogastralen Uebergangs". *Leitlinienprogramm Onkologie*, no. September: 1–51. doi:032-009OL.
- Porschen, R, A Buck, W Fischbach, I Gockel, U Goerling, L Grenacher, S Hollerbach, *et al.* 2015. "Leitlinienreport Der S3-Leitlinie Zur Diagnostik Und Therapie Der Plattenepithelkarzinome Und Adenokarzinome Des Ösophagus." *German Cancer Society*.
- Portess, Daniel I., Georg Bauer, Mark a. Hill, & Peter O'Neill. 2007. "Low-Dose Irradiation of Nontransformed Cells Stimulates the Selective Removal of Precancerous Cells via Intercellular Induction of Apoptosis." *Cancer Research* 67 (3): 1246–53. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2985.
- Portugal, José, Sylvia Mansilla, & Marc Bataller. 2010. "Mechanisms of Drug-Induced Mitotic Catastrophe in Cancer Cells." *Current Pharmaceutical Design* 16 (1): 69–78. doi:10.2174/138161210789941801.
- Prise, K M, O V Belyakov, M Folkard, & B D Michael. 1998. "Studies of Bystander Effects in Human Fibroblasts Using a Charged Particle Microbeam." *International Journal of Radiation Biology* 74 (6): 793–98. doi:10.1080/095530098141087.

- Quah, Ben J C, Hilary S Warren, & Christopher R Parish. 2007. "Monitoring Lymphocyte Proliferation in Vitro and in Vivo with the Intracellular Fluorescent Dye Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester." *Nature Protocols* 2 (9). Nature Publishing Group: 2049–56. doi:10.1038/nprot.2007.296.
- Rainaldi, Gabriella, Antonella Ferrante, Pietro Luigi Indovina, & Maria Teresa Santini. 2003. "Induction of Apoptosis or Necrosis by Ionizing Radiation Is Dose-Dependent in MG-63 Osteosarcoma Multicellular Spheroids." *Anticancer Research* 23 (3B). Greece: 2505–18.
- Riehl, T. E., L. Foster, & W. F. Stenson. 2012. "Hyaluronic Acid Is Radioprotective in the Intestine through a TLR4 and COX-2-Mediated Mechanism." *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 302 (3): G309–16. doi:10.1152/ajpgi.00248.2011.
- Riley, P a. 1994. "Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation." *International Journal of Radiation Biology* 65 (1): 27–33. doi:10.1080/09553009414550041.
- Röck, Katharina, Julia Tigges, Steffen Sass, Alexandra Schütze, Ana-Maria Florea, Anke C Fender, Florian J Theis, et al. 2014. "miR-23a-3p Causes Cellular Senescence by Targeting Hyaluronan Synthase 2: Possible Implication for Skin Aging." *Journal of Investigative Dermatology* 135 (2): 369–77. doi:10.1038/jid.2014.422.
- Rolley, N, S Butcher, & J Milner. 1995. "Specific DNA Binding by Different Classes of Human p53 Mutants." *Oncogene* 11 (4). ENGLAND: 763–70.
- Rothe, G, & G Valet. 1990. "Flow Cytometric Analysis of Respiratory Burst Activity in Phagocytes with Hydroethidine and 2',7'-Dichlorofluorescein." *Journal of Leukocyte Biology* 47 (5): 440–48.
- Rother, Karen, Cindy Johnne, Katja Spiesbach, Ulrike Haugwitz, Katrin Tschöp, Mark Wasner, Ludger Klein-Hitpass, Tarik Mörröy, Joachim Mössner, & Kurt Engeland. 2004. "Identification of Tcf-4 as a Transcriptional Target of p53 Signalling." *Oncogene* 23 (19): 3376–84. doi:10.1038/sj.onc.1207464.
- Rozen, S, & H Skaletsky. 2000. "Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 132. UNITED STATES: 365–86.
- Ruffell, B., & P. Johnson. 2008. "Hyaluronan Induces Cell Death in Activated T Cells through CD44." *The Journal of Immunology* 181 (10): 7044–54. doi:10.4049/jimmunol.181.10.7044.
- Rustom, a. 2004. "Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport." *Science* 303 (5660): 1007–10. doi:10.1126/science.1093133.
- Sabharwal, Simran S., & Paul T. Schumacker. 2014. "Mitochondrial ROS in Cancer: Initiators, Amplifiers or an Achilles' Heel?" *Nature Reviews Cancer* 14 (11). Nature Publishing Group: 709–21. doi:10.1038/nrc3803.
- Sandstrom, P a, M D Mannie, & T M Buttke. 1994. "Inhibition of Activation-Induced Death in T Cell Hybridomas by Thiol Antioxidants: Oxidative Stress as a Mediator of Apoptosis." *Journal of Leukocyte Biology* 55 (February): 221–26.
- Santivasi, Wil L., & Fen Xia. 2014. "Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair." *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (2): 251–59. doi:10.1089/ars.2013.5668.
- Sarbia, M, N Bösing, B Hildebrandt, P Koldovsky, C D Gerharz, & H E Gabbert. 1997. "Characterization of Two Newly Established Cell Lines Derived from Squamous Cell Carcinomas of the Oesophagus." *Anticancer Research* 17 (3C): 2185–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9216685>.
- Savani, R. C., G. Cao, P. M. Pooler, A. Zaman, Z. Zhou, & H. M. DeLisser. 2001. "Differential Involvement of the Hyaluronan (HA) Receptors CD44 and Receptor for HA-Mediated Motility in Endothelial Cell Function and Angiogenesis." *Journal of Biological Chemistry* 276 (39): 36770–78. doi:10.1074/jbc.M102273200.
- Savani, Rc C, C Wang, B Yang, S Zhang, M G Kinsella, T N Wight, R Stern, D M Nance, & E a Turley. 1995. "Migration of Bovine Aortic Smooth Muscle Cells after Wounding Injury. The Role of Hyaluronan and RHAMM." *Journal of Clinical ...* 95 (3): 1158–68. doi:10.1172/JCI117764.
- Schmitt, M., A. Schmitt, M. T. Rojewski, J. Chen, K. Giannopoulos, F. Fei, Y. Yu, et al. 2008. "RHAMM-R3 Peptide Vaccination in Patients with Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndrome, and Multiple Myeloma Elicits Immunologic and Clinical Responses." *Blood* 111 (3): 1357–65. doi:10.1182/blood-2007-07-099366.
- Schrek, Robert. 1955. "Cinmicrographic Observations and Theoretical Considerations on Reactions of Lymphocytes to X-Raysl," no. November.
- Selvakumaran, M, H K Lin, T Miyashita, H G Wang, S Krajewski, J C Reed, B Hoffman, & D Liebermann. 1994. "Immediate Early up-Regulation of Bax Expression by p53 but Not TGF Beta 1: A Paradigm for Distinct Apoptotic Pathways." *Oncogene* 9 (6). ENGLAND: 1791–98.
- Shao, Chunlin, Fiona M Lyng, Melvyn Folkard, & Kevin M Prise. 2006. "Calcium Fluxes Modulate the Radiation-Induced Bystander Responses in Targeted Glioma and Fibroblast Cells." *Radiation Research* 166 (3). United States: 479–87. doi:10.1667/RR3600.1.

- Shen, Yan Nan, Hyun-Jin Shin, Hyun-Yoo Joo, Eun-Ran Park, Su-Hyeon Kim, Sang-Gu Hwang, Sang Jun Park, Chun-Ho Kim, & Kee-Ho Lee. 2014. "Inhibition of HAS2 Induction Enhances the Radiosensitivity of Cancer Cells via Persistent DNA Damage." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443 (3). Elsevier Inc.: 796–801. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.026.
- Shin, Da Young, Euijin Hwang, Il-Hwan Cho, & Myeong Hee Moon. 2007. "Molecular Weight and Structure Characterization of Sodium Hyaluronate and Its Gamma Radiation Degradation Products by Flow Field-Flow Fractionation and on-Line Multiangle Light Scattering." *Journal of Chromatography. A* 1160 (1-2): 270–75. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.047.
- Silva, Marcela Fernandes, Abdur Rehman Khokhar, Muhammad Zahid, & Ammad Ahmad Farooqi. 2014. "MINI-REVIEW Ionizing Radiations Induce Apoptosis in TRAIL Resistant Cancer Cells : In Vivo and in Vitro Analysis" 15 (October 2015): 1905–7. doi:10.7314/APJCP.2014.15.5.1905.
- Sirzén, F, B Zhivotovsky, A Nilsson, J Bergh, & R Lewensohn. 1997. "Spontaneous and Radiation-Induced Apoptosis in Lung Carcinoma Cells with Different Intrinsic Radiosensitivities." *Anticancer Research* 18 (2A): 695–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9615707>.
- Slupphaug, G. 2003. "The Interacting Pathways for Prevention and Repair of Oxidative DNA Damage." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531 1-2): 231–51. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002.
- Sofia Vala, Inês, Leila R. Martins, Natsuko Imaizumi, Raquel J. Nunes, José Rino, François Kuonen, Lara M. Carvalho, *et al.* 2010. "Low Doses of Ionizing Radiation Promote Tumor Growth and Metastasis by Enhancing Angiogenesis." *PLoS ONE* 5 (6): e11222. doi:10.1371/journal.pone.0011222.
- Sohr, Sindy, & Kurt Engeland. 2008. "RHAMM Is Differentially Expressed in the Cell Cycle and Downregulated by the Tumor Suppressor p53." *Cell Cycle* 7 (21): 3448–60. doi:10.4161/cc.7.21.7014.
- Spurgers, Kevin B., David L. Gold, Kevin R. Coombes, Nicole L. Bohnenstiehl, Brian Mullins, Raymond E. Meyn, Christopher J. Logothetis, & Timothy J. McDonnell. 2006. "Identification of Cell Cycle Regulatory Genes as Principal Targets of p53-Mediated Transcriptional Repression." *Journal of Biological Chemistry* 281 (35): 25134–42. doi:10.1074/jbc.M513901200.
- Stahl, Michael, Nils Lehmann, Martin K Walz, Martin Stuschke, & Hansjochen Wilke. 2012. "Prediction of Prognosis after Trimodal Therapy in Patients with Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Oesophagus." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 48 (16). Elsevier Ltd: 2977–82. doi:10.1016/j.ejca.2012.03.010.
- Stein, G H, & V Dulic. 1995. "Origins of G1 Arrest in Senescent Human Fibroblasts." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 17 (6). ENGLAND: 537–43. doi:10.1002/bies.950170610.
- Stern, Robert, & Mark J. Jedrzejas. 2006. "Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action." *Chemical Reviews* 106: 818–39. doi:10.1021/cr050247k.
- Stewart, BW, & CP Wild. 2014. "Global Battle against Cancer Won't Be Won with Treatment Alone--Effective Prevention Measures Urgently Needed to Prevent Cancer Crisis." *Central European Journal of Public Health* 22 (1): 3–4.
- Story, M D, D W Voehringer, C G Malone, M L Hobbs, & R E Meyn. 1994. "Radiation-Induced Apoptosis in Sensitive and Resistant Cells Isolated from a Mouse Lymphoma." *International Journal of Radiation Biology* 66 (6). ENGLAND: 659–68.
- Stretch, J R, K C Gatter, E Ralfkiaer, D P Lane, & a L Harris. 1991. "Expression of Mutant p53 in Melanoma." *Cancer Research* 51 (21): 5976–79.
- Strom, Evguenia, Swati Sathe, Pavel G Komarov, Olga B Chernova, Ivanda Pavlovskaya, Inna Shyshynova, Dmitry a Bosykh, *et al.* 2006. "Small-Molecule Inhibitor of p53 Binding to Mitochondria Protects Mice from Gamma Radiation." *Nature Chemical Biology* 2 (9): 474–79. doi:10.1038/nchembio809.
- Sudha, Prasad N, & Maximas H Rose. 2014. "Beneficial Effects of Hyaluronic Acid." *Advances in Food and Nutrition Research* 72. United States: 137–76. doi:10.1016/B978-0-12-800269-8.00009-9.
- Takazoe, K, G H Tesch, P A Hill, L A Hurst, Z Jun, H Y Lan, R C Atkins, & D J Nikolic-Paterson. 2000. "CD44-Mediated Neutrophil Apoptosis in the Rat." *Kidney International* 58 (5): 1920–30. doi:10.1111/j.1523-1755.2000.00364.x.
- Tammi, R, A M Säämänen, H I Maibach, & M Tammi. 1991. "Degradation of Newly Synthesized High Molecular Mass Hyaluronan in the Epidermal and Dermal Compartments of Human Skin in Organ Culture." *The Journal of Investigative Dermatology*. doi:10.1111/1523-1747.ep12478553.

- Tan, An S, James W Baty, Lan-Feng Dong, Ayenachew Bezawork-Geleta, Berwini Endaya, Jacob Goodwin, Martina Bajzikova, *et al.* 2015. "Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA." *Cell Metabolism* 21 (1). Elsevier Inc.: 81–94. doi:10.1016/j.cmet.2014.12.003.
- Tateishi, Yoshihisa, Eri Sasabe, Eisaku Ueta, & Tetsuya Yamamoto. 2008. "Ionizing Irradiation Induces Apoptotic Damage of Salivary Gland Acinar Cells via NADPH Oxidase 1-Dependent Superoxide Generation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366 (2): 301–7. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.039.
- Termeer, Christian, Frauke Benedix, Jonathon Sleeman, Christina Fieber, Ursula Voith, Thomas Ahrens, Kensuke Miyake, Marina Freudenberg, Christopher Galanos, & Jan Christoph Simon. 2002. "Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4." *The Journal of Experimental Medicine* 195 (1): 99–111. doi:10.1084/jem.20001858.
- Terzian, Tamara, Young Ah Suh, Tomoo Iwakuma, Sean M. Post, Manja Neumann, Gene a. Lang, Carolyn S. Van Pelt, & Guillermina Lozano. 2008. "The Inherent Instability of Mutant p53 Is Alleviated by Mdm2 or p16 INK4a Loss." *Genes and Development* 22 (10): 1337–44. doi:10.1101/gad.1662908.
- Theodoropoulos, Panayotis A., Achille Gravanis, Anna Tsapara, Andrew N. Margioris, Eva Papadogiorgaki, Vassilis Galanopoulos, & Christos Stournaras. 1994. "Cytochalasin B May Shorten Actin Filaments by a Mechanism Independent of Barbed End Capping." *Biochemical Pharmacology* 47 (10): 1875–81. doi:10.1016/0006-2952(94)90318-2.
- Thompson, Deborah, & Douglas Easton. 2004. "The Genetic Epidemiology of Breast Cancer Genes." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 9 (3). United States: 221–36. doi:10.1023/B:JOMG.0000048770.90334.3b.
- Tilghman, J., H. Wu, Y. Sang, X. Shi, H. Guerrero-Cazares, a. Quinones-Hinojosa, C. G. Eberhart, J. Laterra, & M. Ying. 2014. "HMMR Maintains the Stemness and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells." *Cancer Research* 74 (11): 3168–79. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2103.
- Tolg, C., S. R. Hamilton, L. Morningstar, J. Zhang, S. Zhang, K. V. Esguerra, P. G. Telmer, *et al.* 2010. "RHAMM Promotes Interphase Microtubule Instability and Mitotic Spindle Integrity through MEK1/ERK1/2 Activity." *Journal of Biological Chemistry* 285 (34): 26461–74. doi:10.1074/jbc.M110.121491.
- Tolg, Cornelia, James B McCarthy, Arjang Yazdani, & Eva A Turley. 2014. "Hyaluronan and RHAMM in Wound Repair and the 'Cancerization' of Stromal Tissues." *BioMed Research International*. doi:10.1155/2014/103923.
- Tolg, Cornelia, Raymoond Poon, Riccardo Fodde, Eva Ann Turley, & Benjamin Aaron Alman. 2003. "Genetic Deletion of Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (Rhamm) Attenuates the Formation of Aggressive Fibromatosis (desmoid Tumor)." *Oncogene* 22 (44): 6873–82. doi:10.1038/sj.onc.1206811.
- Toole, Bryan P. 2004. "Hyaluronan: From Extracellular Glue to Pericellular Cue." *Nature Reviews Cancer* 4 (7): 528–39. doi:10.1038/nrc1391.
- Turley, E A. 1992. "Hyaluronan and Cell Locomotion." *Cancer and Metastasis Reviews* 11 (1): 21–30. doi:10.1007/BF00047600.
- Turley, Eva A. 1982. "Purification of a Hyaluronate-Binding Protein Fraction That Modifies Cell Social Behavior." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 108 (3): 1016–24. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Twarock, S., M. I. Tammi, R. C. Savani, & J. W. Fischer. 2010. "Hyaluronan Stabilizes Focal Adhesions, Filopodia, and the Proliferative Phenotype in Esophageal Squamous Carcinoma Cells." *Journal of Biological Chemistry* 285 (30): 23276–84. doi:10.1074/jbc.M109.093146.
- Tyan, Shiaw-Wei, Wen-Hung Kuo, Chun-Kai Huang, Chi-Chun Pan, Jin-Yuh Shew, King-Jen Chang, Eva Y.-H. P. Lee, & Wen-Hwa Lee. 2011. "Breast Cancer Cells Induce Cancer-Associated Fibroblasts to Secrete Hepatocyte Growth Factor to Enhance Breast Tumorigenesis." *PLoS ONE* 6 (1): e15313. doi:10.1371/journal.pone.0015313.
- Tzankov, Alexandar, Ulrich Strasser, Stephan Dirnhofer, Thomas Menter, Caroline Arber, Martine Jotterand, Alicia Roivo, Andre Tichelli, Reinhard Stauder, & Ursula Gunthert. 2011. "In Situ RHAMM Protein Expression in Acute Myeloid Leukemia Blasts Suggests Poor Overall Survival." *Annals of Hematology* 90 (8). Germany: 901–9. doi:10.1007/s00277-011-1159-6.
- Tzircotis, George, Rick F Thorne, & Clare M Isacke. 2005. "Chemotaxis towards Hyaluronan Is Dependent on CD44 Expression and Modulated by Cell Type Variation in CD44-Hyaluronan Binding." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 21): 5119–28. doi:10.1242/jcs.02629.

- van Hagen, P., M.C.C.M. Hulshof, J.J.B. van Lanschot, E.W. Steyerberg, M.I. Van Berge Henegouwen, B.P.L. Wijnhoven, D.J. Richel, *et al.* 2012. "Preoperative Chemoradiotherapy for Esophageal or Junctional Cancer." *New England Journal of Medicine* 366 (22): 2074–84. doi:10.1056/NEJMoa1112088.
- Vaseva, Angelina V., & Ute M. Moll. 2009. "The Mitochondrial p53 Pathway." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787 (5). Elsevier B.V.: 414–20. doi:10.1016/j.bbabi.2008.10.005.
- Vaupel, Peter, & Arnulf Mayer. 2007. "Hypoxia in Cancer: Significance and Impact on Clinical Outcome." *Cancer Metastasis Reviews* 26 (2). Netherlands: 225–39. doi:10.1007/s10555-007-9055-1.
- Veisheh, M., D. H. Kwon, A. D. Borowsky, C. Tolg, H. S. Leong, J. D. Lewis, E. A. Turley, & M. J. Bissell. 2014. "Cellular Heterogeneity Profiling by Hyaluronan Probes Reveals an Invasive but Slow-Growing Breast Tumor Subset." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (17): E1731–39. doi:10.1073/pnas.1402383111.
- Vigetti, Davide, Eugenia Karousou, Manuela Viola, Sara Deleonibus, Giancarlo De Luca, & Alberto Passi. 2014. "Hyaluronan: Biosynthesis and Signaling." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (8). Elsevier B.V.: 2452–59. doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.001.
- Wang, C, A D Thor, D H Moore, Y Zhao, R Kerschmann, R Stern, P H Watson, & E A Turley. 1998. "The Overexpression of RHAMM, a Hyaluronan-Binding Protein That Regulates Ras Signaling, Correlates with Overexpression of Mitogen-Activated Protein Kinase and Is a Significant Parameter in Breast Cancer Progression." *Clinical Cancer Research* 4 (3): 567–76. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/4/3/567.abstract>.
- Wang, Fengyuan, Gang Shu, Xi Peng, Jing Fang, Kejie Chen, Hengmin Cui, Zhengli Chen, *et al.* 2013. "Protective Effects of Sodium Selenite against Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Broiler Spleen." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (7): 2834–44. doi:10.3390/ijerph10072834.
- Wang, X, & H-H Gerdes. 2015. "Transfer of Mitochondria via Tunneling Nanotubes Rescues Apoptotic PC12 Cells." *Cell Death and Differentiation* 22 (7). Nature Publishing Group: 1181–91. doi:10.1038/cdd.2014.211.
- Wang, Y, J Cui, X Sun, & Y Zhang. 2011. "Tunneling-Nanotube Development in Astrocytes Depends on p53 Activation." *Cell Death and Differentiation* 18 (4). Nature Publishing Group: 732–42. doi:10.1038/cdd.2010.147.
- Wang, Yan, Mark E Lauer, Sanjay Anand, Judith a Mack, & Edward V Maytin. 2014a. "Hyaluronan Synthase 2 Protects Skin Fibroblasts against Apoptosis Induced by Environmental Stress." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (46): 32253–65. doi:10.1074/jbc.M114.578377.
- Wang, Z., Y. Wu, H. Wang, Y. Zhang, L. Mei, X. Fang, X. Zhang, *et al.* 2014b. "Interplay of Mevalonate and Hippo Pathways Regulates RHAMM Transcription via YAP to Modulate Breast Cancer Cell Motility." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (1): E89–98. doi:10.1073/pnas.1319190110.
- Weissmann, B, K Meyer, P Sampson, & A Linker. 1954. "Isolation of Oligosaccharides Enzymatically Produced From Hyaluronic Acid." *J Biol Chem* 208: 417–29.
- Xu, Guoshun, Hongying Wu, Junling Zhang, Deguan Li, Yueying Wang, Yingying Wang, Heng Zhang, *et al.* 2015. "Metformin Ameliorates Ionizing Irradiation-Induced Long-Term Hematopoietic Stem Cell Injury in Mice." *Free Radical Biology & Medicine* 87 (October). United States: 15–25. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.045.
- Xu, Shuai, Nan Ding, Hailong Pei, Wentao Hu, Wenjun Wei, Xurui Zhang, Guangming Zhou, & Jufang Wang. 2015. "MiR-21 Is Involved in Radiation-Induced Bystander Effects." *RNA Biology* 11 (March 2015): 1161–70. doi:10.4161/rna.34380.
- Yadav, Arun A, Daywin Patel, Xing Wu, & Brian B Hasinoff. 2013. "Molecular Mechanisms of the Biological Activity of the Anticancer Drug Elesclomol and Its Complexes with Cu(II), Ni(II) and Pt(II)." *Journal of Inorganic Biochemistry* 126. Elsevier Inc.: 1–6. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.04.013.
- Yamaguchi, Takeshi, Hirofumi Mukai, Satoshi Yamashita, Satoshi Fujii, & Toshikazu Ushijima. 2015. "Comprehensive DNA Methylation and Extensive Mutation Analyses of HER2-Positive Breast Cancer." *Oncology* 88 (6). Karger Publishers: 377–84. doi:10.1159/000369904.
- Yamamori, Tohru, Hironobu Yasui, Masayuki Yamazumi, Yusuke Wada, Yoshinari Nakamura, Hideo Nakamura, & Osamu Inanami. 2012. "Ionizing Radiation Induces Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production Accompanied by Upregulation of Mitochondrial Electron Transport Chain Function and Mitochondrial Content under Control of the Cell Cycle Checkpoint." *Free Radical Biology and Medicine* 53 (2). Elsevier: 260–70. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033.
- Yamazaki, Yutaka, Itsuo Chiba, Atsuko Hirai, Ken-ichi Notani, Haruhiko Kashiwazaki, Kanchu Tei, Yasunori Totsuka, Tadashi Iizuka, Takao Kohgo, & Hiroshi Fukuda. 2003. "Radioresistance in

- Oral Squamous Cell Carcinoma with p53 DNA Contact Mutation." *American Journal of Clinical Oncology* 26 (5). United States: e124–29. doi:10.1097/01.coc.0000091352.60347.f8.
- Yang, Baihua, Liying Zhang, & Eva Ann Turley. 1993. "Identification of Two Hyaluronan-Binding Domains in the Hyaluronan Receptor RHAMM." *Journal of Biological Chemistry* 268 (12): 8617–23.
- Yoshida, Hiroyuki, Aya Nagaoka, Ayumi Kusaka-Kikushima, Megumi Tobiishi, Keigo Kawabata, Tetsuya Sayo, Shingo Sakai, *et al.* 2013. "KIAA1199, a Deafness Gene of Unknown Function, Is a New Hyaluronan Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (14): 5612–17. doi:10.1073/pnas.1215432110.
- Yu, Chan-Juan, Jiang-Hua Ou, Ming-Long Wang, Nuerbolati Jialielihan, & Ya-Hua Liu. 2015. "Elevated Survivin Mediated Multidrug Resistance and Reduced Apoptosis in Breast Cancer Stem Cells." *J BUON* 20 (5): 1287–94.
- Zhang, Jiang Hui, & You Yi Zhang. 2013. "Membrane Nanotubes: Novel Communication between Distant Cells." *Science China Life Sciences* 56 (11): 994–99. doi:10.1007/s11427-013-4548-3.
- Zhang, Mengxian, Susanne Kleber, Manuel Röhrich, Carmen Timke, Na Han, Jochen Tuettenberg, Ana Martin-Villalba, *et al.* 2011. "Blockade of TGF- β Signaling by the TGF β R-I Kinase Inhibitor LY2109761 Enhances Radiation Response and Prolongs Survival in Glioblastoma." *Cancer Research* 71 (23): 7155–67. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1212.
- Zhang, Shiwen, Michael C Y Chang, Danuta Zylka, Stefanie Turley, Rene Harrison, & Eva A Turley. 1998. "The Hyaluronan Receptor RHAMM Regulates Extracellular-Regulated Kinase." *J Biol Chem* 273 (18): 11342–48.
- Zhivotovsky, B, B Joseph, & S Orrenius. 1999. "Tumor Radiosensitivity and Apoptosis." *Experimental Cell Research* 248 (1): 10–17. doi:10.1006/excr.1999.4452.
- Zhou, B., J. A. Weigel, L. Fauss, & P. H. Weigel. 2000. "Identification of the Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE)." *Journal of Biological Chemistry* 275 (48): 37733–41. doi:10.1074/jbc.M003030200.
- Zhou, Hongning, Vladimir Ivanov, Yu-Chin Lien, Mercy Davidson, & Tom Hei. 2008. "Mitochondrial Function and NF- κ B Mediated Signaling in Radiation-Induced Bystander Effects." *Cancer Research* 68 (7): 2233–40. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5278.Mitochondrial.
- Zlobec, I, K Baker, L Terracciano, S Peter, L Degen, C Beglinger, & a Lugli. 2008. "Two-Marker Protein Profile Predicts Poor Prognosis in Patients with Early Rectal Cancer." *British Journal of Cancer* 99 (10): 1712–17. doi:10.1038/sj.bjc.6604729.

10. Anhang

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer	Zusammensetzung
sub-G1-Lysepuffer	0,1 % Natriumcitrat (Carl Roth, Karlsruhe) 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis)
RIPA	50 mM Tris-Salzsäure pH 7,4 1% Triton X-100 0,5% Na-deoxycholate 0,1 % Natriumdodecylsulfat 150 mM NaCl, pH = 8,0
Protease- und Phosphatase-Inhibitoren	0,2 mM Na-Orthovanadat 1 mM Phenylmethysulfonylfluorid 10 mM Natriumfluorid 1x Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis)
2x Laemmli-Puffer	150 mM Tris 6,8 4 % Natriumdodecylsulfat 20 % Glycerol 8 % β -mercaptoethanol 0,02 % Bromophenolblau
Laufpuffer	14,4 g/L Glycin 1 g/L Natriumdodecylsulfat 3 g/L Tris
Blotpuffer	3 g/L Tris 14,4 g/L Glycin 20 % Methanol
TBS	10mM Tris 150mM Natriumchlorid pH=7,6
TBST	10 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 0,1 % Tween® 20 pH=7,6
Essigsaurer Puffer	3,7 % Formaldehyd 70 % Ethanol 5 % Eisessig in PBS
HBSS	0,137 M Natriumchlorid 5,4 mM Kaliumchlorid 0,25 mM Dinatriumhydrogenphosphat 0,1g Glucose 0,44 mM Kaliumhydrogenphosphat 1,3 mM Kalziumchlorid 1,0 mM Magnesiumsulfat 4,2 mM Natriumhydrogencarbonat
PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 7,8 mM Dinatriumhydrogenphosphat x 2H ₂ O pH = 7,4

Tabelle 9: Zusammensetzung der Gele für die Western Blot-Analyse.

Sammelgel	pro Gele (mL)	Trenngel	pro Gele (mL)	Hersteller
Wasser	4,8	Wasser	4,35	-
Rotiphoese Gel 40	2,5	Rotiphoese Gel 40	0,75	Carl Roth, Karlsruhe
1,0 M Trizma® base pH = 6,8	2,5	1,5 M Trizma® base pH = 8,8	0,75	Sigma-Aldrich, St. Louis
10 % SDS	0,1	10 % SDS	0,06	Carl Roth, Karlsruhe
Temed	0,1	Temed	0,06	Sigma-Aldrich, St. Louis
10 % APS	0,004	10 % APS	0,006	Sigma-Aldrich, St. Louis

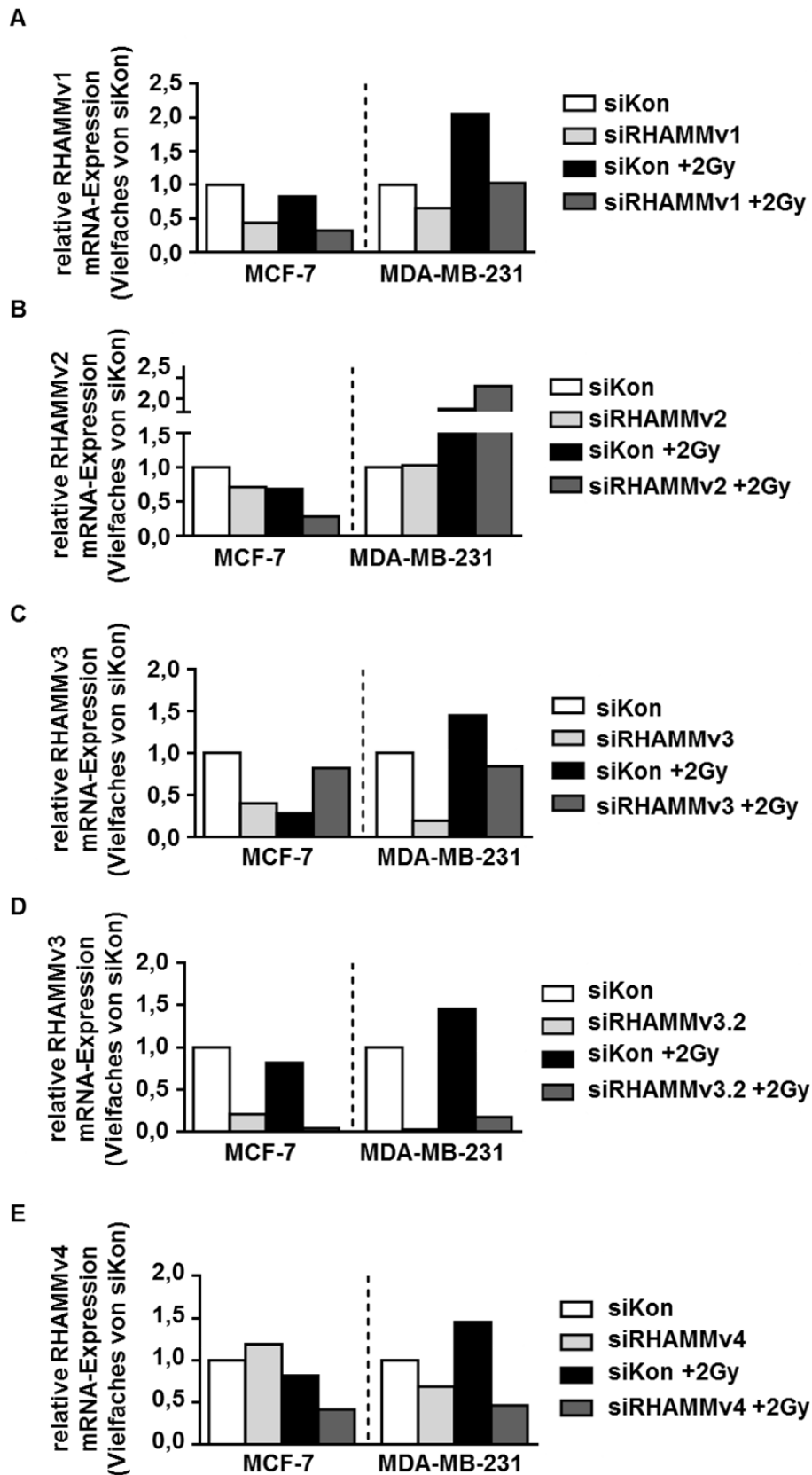


Abbildung 41: Transfektionseffizienz der designierten siRNAs der *RHAMM*-Varianten. MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurden in Duplikaten (zwei unterschiedliche Passagen der Zelllinien) ausgesät. 48 h nach der Transfektion und 24 h nach der Bestrahlung wurde die RNA isoliert. Die Duplikate wurden gepoolt und in der qRT-PCR analysiert. Die mRNA-Expression von A, siRHAMMv1, B, siRHAMMv2, C, siRHAMMv3, D, siRHAMMv3.2 und E, siRHAMMv4 sind gezeigt.

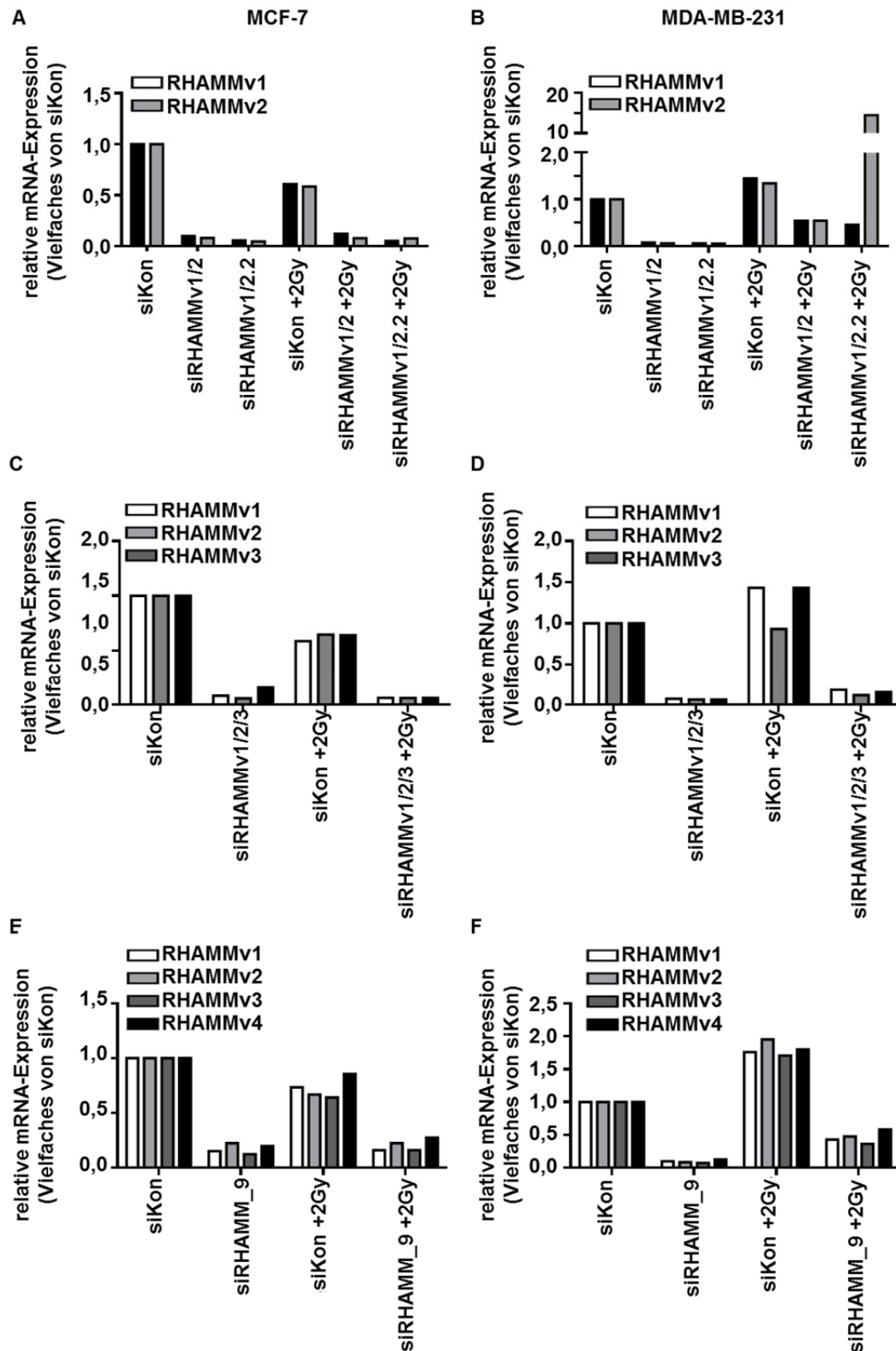


Abbildung 42: Transfektionseffizienz der designierten siRNAs der *RHAMM*-Varianten-Kombinationen. MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurden in Duplikaten (zwei unterschiedliche Passagen der Zelllinien) ausgesät. 48 h nach der Transfektion und 24 h nach der Bestrahlung wurde die RNA isoliert. Die Duplikate wurden gepoolt und in der qRT-PCR analysiert. Die mRNA-Expression von A, zwei verschiedenen siRNAs gegen *RHAMMv1/2* in MCF-7 und B, MDA-MB-231-Zellen. C, Die Transfektionseffizienz von siRNA gegen *RHAMMv1/2/3* in MCF-7- und D, MDA-MB-231-Zellen ist gezeigt. E, Die Transfektionseffizienz von siRHAMMpan (der herkömmlichen siRHAMM gegen alle *RHAMM*-Varianten; siRHAMM_9) in MCF-7- und F, MDA-MB-231-Zellen ist gezeigt.

11. Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Fischer herzlich für die Betreuung und die Erfahrungen bedanken, die ich während meiner Doktorarbeitszeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie machen konnte. Mein Dank gilt außerdem Katharina Röck, die immer ein offenes Ohr bzw. Handy für mich hatte. Mir werden die gemeinsamen Brainstormings sehr fehlen.

Weiterhin möchte ich mich bei den PIs des GRK 1739 bedanken, besonders Prof. Verena Jendrossek, Prof. George Iliakis und Prof. Shirley Knauer, die es geschafft haben, durch ihren Ansporn zu Durchhaltevermögen, Leidenschaft und Motivation, die Zeit im GRK lehrreich und inspirierend verlaufen zu lassen. Den Mitkollegiaten Ines Rudolf, Kristina Bannik, Sarah Wieczorek, Alina Dressler, Evgenija Mersch, Elisabeth Schröder, Simone de Leve, Violetta Ritter, Vanessa Verhelst und Johann Matschke sowie allen anderen möchte ich für die gemeinsame Zeit bei etlichen Seminaren, Retreats und die Versorgung mit Protokollen danken.

Bei Frau Lohmann, Frau Montag und Ivonne Schulte möchte ich mich für die Bewältigung jeglicher administrativer Fragestellungen bedanken. Zudem gilt auch ein herzlicher Dank an Beate Weyrauther, Petra Rompel, Kerstin Freidel, Kirsten Bartkowski, Bärbel Reupert, Irmhild Rüter und Annika Zimmermann für die Hilfestellungen im Labor sowie Detlev Rohrbach für die Umsetzung so mancher technischer Ideen.

Für die tolle Zusammenarbeit mit Christian Vogeley, Janna Morawitz, Jessica Wladarz und Jonas Butschan möchte ich mich ebenfalls bedanken. Wir rücken.

Vielen Dank, Maria Grandoch, Till Freudenberger, Sören Twarock und Anke Fender für die stetige Ansprechmöglichkeit. Ganz besonderer Dank gilt Julia Bayer-Maier, Christina Kohlmorgen, Kathrin Feldmann und Julia Müller für die gefühlt tausenden gelaufenen Kilometer, die sich inzwischen sogar in drei Halbmarathonläufen und einem erfahrungsreichen Hindernislauf widerspiegeln. Vielen Dank, Inga Kretschmer und Fabian Seiler, für eine tolle Zeit, in der die nächtlichen Laboraufenthalte sehr viel lustiger wurden. Ohne euch wäre die Zeit nicht halb so schön gewesen.

Bei dir, Andi, möchte ich mich für deine Fürsorge und Ablenkung bedanken sowie deiner Gesellschaft, wenn es doch mal wieder „etwas“ später geworden ist. Du hast meine Launen so tapfer durchgestanden. Durch deine Liebe fühle ich mich vollkommen. Für immer.

Meinen Eltern gebührt ganz besonderer Dank. Vor allem dir, Mama, die du so akribisch alle Komma- und Satzzeichenfehler aufgedeckt hast und jetzt auch weißt, warum Gennamen kursiv geschrieben werden. Vielen Dank für die Unterstützung, Kraft und Zuneigung, die ihr mir schon immer geschenkt habt. Ich verdanke euch alles. In Liebe.

12. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen
des Datenschutzes nicht enthalten.

12.1. Veröffentlichungen

12.1.1. Fachzeitschriften

Röck K, Tigges J, Sass S, **Schütze A**, Florea A-M, Fender AC, Theis FJ, Krutmann J, Boege F, Fritsche E, Reifenberger G und Fischer JW. miR-23a-3p Causes Cellular Senescence by Targeting Hyaluronan Synthase 2: Possible Implication for Skin Aging. *J. Invest. Dermatol* 2014. **135**, 369–377.

Schütze A, Vogeley C, Gorges T, Twarock S, Butschan J, Babayan A, Klein D, Knauer S, Metzen E, Müller V, Jendrossek V, Pantel K, Milde-Langosch K, Fischer JW und Röck K. RHAMM splice variants present a prognostic and therapeutic target for radiotherapy in human breast cancer. *Oncotarget in revision*

12.1.2. Veröffentlichte Kongressbeiträge

Schütze A, Röck K, Fischer JW. Interrelationship of the stromal hyaluronan matrix and tumor cell survival in response to ionizing radiation. *Forschungstag der medizinischen Fakultät*, UDE 2012.

Schütze A, Röck K, Jänicke R U, Fischer JW. Ionizing radiation of esophageal carcinomas leads to alterations of the hyaluronan matrix and stroma mediated cell death of tumor cells in vitro. *Eur J Cancer* 2013; 49 (suppl. 2): 324 (A1104).

Schütze A, Röck K, Sack M, Brenneisen P, Jendrossek V, Fischer JW. Radiation mediated cell death of esophagous squamous cell carcinoma cells is enhanced by down-regulation of stromal hyaluronan synthase 2. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2014; 387 (Suppl 1): S1-S113. (A362)

Schütze A, Röck K, Sack M, Brenneisen P, Jendrossek V, Fischer JW. Radiation mediated down-regulation of stromal hyaluronan synthase 2 enhances esophagous carcinoma cell death. *Cancer bulletin* 2015; 10 (3): 38 (A50).

Schütze A, Röck K, Morawitz J, Sack M, Brenneisen P, Jendrossek V, Fischer JW. Downregulation of Hyaluronan Synthase 2 is critically involved in Stroma mediated tumor cell death after ionizing radiation. *International Society for Hyaluronan Sciences* 2015; (A183).

13. Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Der Einfluss des Hyaluronsäure-Systems auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Alexandra Schütze befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Düsseldorf, den _____

Unterschrift des wissenschaftlichen Betreuers/
Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) und e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Düsseldorf, den _____

Unterschrift der Doktorandin

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) und f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den _____

Unterschrift der Doktorandin